

**ACTA MEDICA SZEGED.**

TOM. XII. FASC. 1.

---

# **EXPERIMENTELLE CHEMOTHERAPIE DER BAKTERIELLEN INFEKTIONEN**

VON

**GEÖRG IVÁNOVICS**

O. Ö. PROFESSOR UND VORSTAND  
DES INSTITUTES FÜR ALLG. PATHOLOGIE  
UND BAKTERIOLOGIE DER KGL. UNG.  
NICOLAUS v. HORTHY UNIVERSITÄT  
IN SZEGED, UNGARN

MIT 9 ABBILDUNG UND 40 TABELLEN IM TEXT



1944

---

JOHANN AMBROSIOUS BARTH VERLAGSBUCHHANDLUNG LEIPZIG  
EGGENBERGERSCHER BUCHHANDLUNG KARL RÉNYI BUDAPEST



# ACTA MEDICA SZEGED.

TOM. XII. FASC. 1.

---

## EXPERIMENTELLE CHEMOTHERAPIE DER BAKTERIELLEN INFEKTIONEN

VON

**GEORG IVÁNOVICS**

O. Ö. PROFESSOR UND VORSTAND  
DES INSTITUTES FÜR ALLG. PATHOLOGIE  
UND BAKTERIOLOGIE DER KGL. UNG.  
NICOLAUS v. HORTHY UNIVERSITÄT  
IN SZEGED, UNGARN

MIT 9 ABBILDUNG UND 40 TABELLEN IM TEXT



1944

---

JOHANN AMBROSIOUS BARTH VERLAGSBUCHHANDLUNG LEIPZIG  
EGGENBERGERSCHER BUCHHANDLUNG KARL RÉNYI BUDAPEST

PRINTED IN HUNGARY

ALLE RECHTE,  
BESONDERS DAS DER ÜBERSETZUNG IN FREMDE SPRACHEN,  
VORBEHALTEN

EDITOR:

UNIVERSITATE REGIA HUNGARICA DE NICOLAO HORTHY NOMINATA  
FUNDOQUE ROTHERMEREIANO ADIUVANTIBUS  
SODALITAS AMICORUM EIUSDEM UNIVERSITATIS

REDIGUNT : I. BALÓ, I. BATIZFALVY et G. IVÁNOVICS

EINGEGANGEN AM 25. JANUAR 1944

SZEGED STÄDTISCHE DRUCKEREI UND  
BUCHVERLAGS-A. G.

# INHALTSVERZEICHNIS.

|  | Seite |
|--|-------|
| <b>Einleitung</b>  | 5     |
| <br><b>Teil A) Das Sulfanilamid und seine Derivate.</b>                              |       |
| I. Kapitel. <b>Die Entdeckung des Prontosil</b>                                      | 9     |
| II. Kapitel. <b>Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate in Tierversuchen</b>         | 12    |
| 1. Allgemeine Gesichtspunkte   | 12    |
| 2. Technik der Mäuseschutzversuche   | 19    |
| a) Unterbringung und Fütterung der Versuchstiere                                     | 19    |
| b) Die zu den Infektionen verwendeten Bakteriumstämme und ihre Virulenz              | 19    |
| c) Die Infizierung der Tiere   | 21    |
| d) Behandlung der Tiere  | 21    |
| e) Beobachtung der Versuchstiere   | 27    |
| 3. Methoden zur Vergleichung der Wirkung der Präparate und Auswertung der Ergebnisse | 29    |
| a) Orientierende Versuche  | 29    |
| b) Bestimmung der Wirksamkeit der Präparate durch vergleichende Titrierung           | 34    |
| 4. Neue Gesichtspunkte bei der Wertbestimmung der Chemotherapeutica                  | 40    |
| III. Kapitel. <b>In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate</b>                       | 49    |
| 1. Die die In-vitro-Wirkung beeinflussenden Versuchsfaktoren                         | 49    |
| 2. Messung der In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate                             | 53    |
| IV. Kapitel. <b>Mechanismus der direkten Wirkung des Sulfanilamid</b>                | 62    |
| 1. Morphologische und biologische Zeichen der direkten Wirkung                       | 62    |
| 2. Ist das p-Aminobenzolsulfonamid der Träger der direkten Wirkung?                  | 67    |
| 3. Die mit Sulfanilamidderivaten zusammenhängenden Interferenzerscheinungen          | 71    |
| 4. Die physiologische Rolle der p-Aminobenzoesäure                                   | 80    |

|   |     |
|---|-----|
| 5. Nähere Verhältnisse des zwischen Sulfanilamid und p-Aminobenzoesäure bestehenden Antagonismus. Wesen der Sulfanilamidwirkung . . . . . | 82  |
| V. Kapitel. <b>Beziehungen der chemischen Struktur zur Wirkung</b> . . . . .  | 93  |
| VI. Kapitel. <b>Mechanismus der therapeutischen Sulfanilamidwirkung</b> . . . . .   | 106 |
| 1. Kommt die bakteriostatische Wirkung im Organismus zur Geltung? . . . . .   | 106 |
| 2. Die Rolle der Abwehrreaktion des Organismus . . . . .  | 110 |
| 3. Quantitative Zusammenhänge zwischen der In-vitro-- und In-vivo-Wirkung . . . . .   | 118 |
| VII. Kapitel. <b>Das Problem der Sulfanilamidresistenz</b> . . . . .  | 118 |

### Teil B)

|  |     |
|--|-----|
| VIII. Kapitel. <b>Antibiotische Eigenschaften und Wirkungsweise der Salicylsäure</b> . . . . . | 124 |
| 1. Die „antiseptische“ Wirkung der Salicylsäure bzw. der Salicylate . . . . .                  | 124 |
| 2. Nähere Verhältnisse der Pantothen säureinterferenz . . . . .                                | 128 |
| 3. Ist die Wirkung charakteristisch für das Salicylatmolekül? . . . . .                        | 134 |
| 4. Wirkungsweise des Salicylat-Ions . . . . .  | 137 |
| 5. Ist das Salicylat ein echtes Chemotherapeuticum? . . . . .                                  | 143 |
| IX. Kapitel. <b>Über die sogenannten Antivitamine</b> . . . . .                                | 146 |
| 1. Die sulfosäuren Analogen der Nikotinsäure bzw. des Nikotinsäureamids . . . . .              | 147 |
| 2. Sulfiopantothen säure (Pantoyltaurin) . . . . .   | 148 |
| 3. Der Lactoflavin antagonist . . . . .  | 149 |
| Schrifttum. . . . .  | 151 |

## Einleitung.

Die Einfachheit der Bakterienzüchtung ermöglichte, die auf die Bakterien wirkenden schädlichen Einflüsse kurz nach ihrer Entdeckung systematisch zu erforschen. Die Erkenntnis der antiseptischen bzw. desinfizierenden Wirkung einzelner chemischer Stoffe führte mit einer Selbstverständlichkeit zur Erpropfung der im Reagenzglas hochwirksamen Mittel in Tierversuchen als „innere Desinfizienzien“. Es würde zu weit führen, auf die Frühperiode dieser Versuche ausführlich einzugehen, darum soll allein auf die bekannten Sublimat- und Goldversuche von *R. Koch* am Anfang der achtziger Jahre verwiesen werden. Ausgehend von der Erfahrung, dass das Sublimat die Entwicklung der Milzbrandbazillen selbst in der Verdünnung 1:100.000 hemmte, versuchte er, die milzbrandkranken Tiere mit dieser Verbindung zu heilen. Diese Versuche waren ebenso erfolglos, wie die Behandlung tuberkulöser Meerschweinchen mit dem *in vitro* gegen die Tuberkelbazillen durchaus wirksamen Kaliumaurocyanat. Obwohl diese Versuche erfolglos verliefen, waren sie doch bedeutsam, da der Gedanke der „inneren Desinfektion“, ergänzt mit dem von *Ehrlich* eingeführten Begriff der „Parasitotropie“, bei den Protozoeninfektionen — im Gegensatz zu den bakteriellen — schliesslich zu einem Siege führte, dessen Früchte die Menschheit seit nahe vierzig Jahren geniesst.

Obwohl in unserem Klima die Bedeutung der bakteriellen Erkrankungen die der Protozoeninfektionen weit übertrifft, konnte die Medizin im Kampfe der ersterwähnten Krankheitsgruppe erst viel später beträchtliche Erfolge erzielen. Es ist kaum eine Übertreibung zu behaupten, dass bis zum Jahre 1933 — *Domagks* Entdeckung — für die Chemotherapie der bakteriellen Infektionen kein praktisch wertvolles Mittel zur Verfügung stand. Zweifelsohne verwendeten die Kliniker versuchsweise schon vor dem Prontosil verschiedene „innere Desinfizienzien“. Diese Versuche sind bei wohlwollender Beurteilung als bescheidene Anzeichen der Chemotherapie bakterieller Infektionen anzusehen. Die zu dieser Zeit verwendeten Mittel bedeuteten nur für einige Optimisten die Chemotherapie; die meisten Kliniker legten ihrer Verwendung nur wenig Bedeutung bei, da insbesondere *sie sich in Tierversuchen nicht bewährten*. Aus dieser Vorprontosilperiode sind mehrere „Chemotherapeutica“ bekannt; es genügt, von ihnen das Salicyl und seine Derivate, einige Farbstoffe wie die Thiazin- und Acridinderivate zu erwähnen. Selbst die mit diesen Mitteln von problematischer Wirksamkeit erzielten wenig ermunternden Ergebnisse übten auf die experimentelle Medizin einen Einfluss aus, in dessen Folge zahlreiche Derivate und verwandte Verbindun-

gen der erwähnten hergestellt und erprobt wurden. Die Begeisterung, die von der Wirkung verschiedener Chinolinderivate (Optochin, Vuzin) ausgelöst wurde, erwies sich als verfrüht, dennoch werden diese Mittel in entsprechenden Fällen auch heute manchmal verwendet.

Die systematische Erforschung der Chemotherapie der bakteriellen Infektionen wurde dadurch erleichtert, dass hier — im Gegensatz zu den Protozooninfektionen — In-vitro-Versuche mühelos angestellt werden können. Demnach ist es gar nicht erstaunlich, dass die Forschungen fast ausnahmslos von Reagenzglasversuchen ausgingen. So günstig auch dieser Umstand scheint, war er in der Tat für die Entwicklung eher nachteilig, und man könnte sagen, dass der In-vitro-Versuch für die Entwicklung der Bakteriumchemotherapie zu einer wahren Falle geworden ist. Heute ist es klar, warum dieser Weg zu einem toten Punkt führte, denn das Ausmass, in dem die desinfizierende und noch mehr die bakterio-statische Wirkung eines Mittels zur Geltung kommt, hängt in entscheidender Weise von der Versuchsmethode ab. Der Sieg der Chemotherapie der bakteriellen Infektionen ist gerade der Tatsache zu verdanken, dass *Domagk*, unbekümmert um die Ergebnisse der Reagenzglasversuche, die Mittel nur bei Tierversuchen prüfte. Die Auswahl des Versuchsobjektes — die mit hämolytischen Streptokokken infizierte Maus — war ausserordentlich glücklich. Hätte *Domagk* den alten Weg eingeschlagen und nur In-vitro-Versuche angestellt, so wäre die chemotherapeutische Wirksamkeit des Sulfanilamid vielleicht noch immer nicht erkannt. Denn das grösste Geheimnis im Mechanismus der Prontosilwirkung wurde anfangs darin gefunden, dass die hämolytischen Streptokokken selbst in einer 2% igen Lösung nicht getötet werden. Diese Erkenntnis hat früher zur Vermutung Anlass gegeben, dass das Prontosil nicht im Sinne des *Ehrlichschen* Gedankens direkt auf den Erreger, sondern auf einem ganz anderen Wege wirke. So gelangte die theoretische Chemotherapie vorübergehend auf einen toten Punkt, aber nicht lange. Bald verfügte man über hinreichende Versuchsdaten um zu zeigen, dass der *Ehrlichsche* Gedanke auch bei Prontosil und seinen Verwandten Gültigkeit hat. Heute steht es bereits fest, dass diese Mittel unter entsprechenden Versuchsbedingungen, unter anderen auch im Organismus, eine mächtige bakterio-statische Wirkung entfalten. Die Vervollkommnung der Technik zur Messung der antibiotischen Wirksamkeit der Sulfanilamide brachte zunächst eine entscheidende Wendung in bezug auf den Wirkungsmechanismus des Prontosil und der verwandten Verbindungen, überdies hat sich diese Technik auch bei der Prüfung der früheren antiseptischen Mittel bewährt. Unter anderem wurde hierdurch der Mechanismus der antiseptischen Wirkung des Salicylats geklärt. In der Entwicklung der Chemotherapie hat sich auch die Erforschung des intermediären Bakteriumstoffwechsels — obwohl vorläufig nur in theoretischer Beziehung — als eine Methode von höchster Bedeutung erwiesen. Merkwürdigerweise taucht die Wichtigkeit dieser Richtung schon bei *Domagk* auf, wie aus nachstehendem Satz seiner 1936 erschienenen Arbeit hervorgeht: „Gerade der Ausbau der Verwendung synthetischer Nährböden zur Erforschung des Bakteriumstoffwechsels scheint mir von grosser Bedeutung auch für die weitere



Entwicklung einer wissenschaftlich aufbauenden Chemotherapie zu sein.“

Diese Monographie hat nicht den Zweck, das Problem der Chemotherapie bakterieller Infektionen mit einer erschöpfenden Ausführlichkeit zu behandeln, sie erstreckt sich lediglich auf Beobachtungen, die für die Erkenntnis des Wirkungsmechanismus der chemotherapeutisch wirksamen Präparate von besonderer Wichtigkeit sind. Manche Stoffe, die in den Lehr- und Handbüchern in der Gruppe der gegen Bakterien wirksamen Chemotherapeutica angeführt werden — z. B. die Goldverbindungen, die Chaulmoograsäure und ihre Ester — werden in dieser Arbeit nicht erwähnt, zumal unsere Kenntnisse in bezug auf ihren Wirkungsmechanismus kaum eine nennenswerte Erweiterung erfahren haben. Dagegen dürfen die Versuche mit einigen vom praktischen Gesichtspunkt aus nicht als Chemotherapeutica anzusehenden Verbindungen (z. B. mit Sulfopantothensäure) nicht unerwähnt bleiben, da sie für die weitere Entwicklung der theoretischen Chemotherapie noch belangreich sein können.





## Teil A.

# Das Sulfanilamid und seine Derivate.

## I. Kapitel.

### Die Entdeckung des Prontosil.

Das Prontosil wurde im Jahre 1932 von *Mietzsch* und *Klarer*<sup>275</sup> synthetisiert. Noch im selben Jahre hat *Domagk*<sup>74</sup> festgestellt, dass das Prontosil rubrum, das 4-Sulfamido-2',4'-diaminoazobenzol, gegen die allgemeine Streptokokkeninfektion eine derart energische Heilwirkung besitzt, dass sie in der experimentellen Medizin ohnegleichen steht. Seine ersten Beobachtungen — die er erst 1935 publizierte — lassen sich mit dem hier zu beschreibenden Versuch veranschaulichen. Zehn bestimmt tödliche Dosen eines mässig virulenten hämolytischen Streptokokkenstammes (d. l. m. =  $3 \times 10^{-5}$  ccm Bouillonkultur) wurden Mäusen intraperitoneal injiziert. 14 Kontrolltiere dieser Gruppe gingen innerhalb 24—48 Stunden ausnahmslos ein, während die identisch infizierten 12 Tiere, die per os 10—500 mg/kg Prontosil erhielten, sich selbst eine Woche später als gesund erwiesen. Dieses überraschende Ergebnis war um so ermunternder, als das Mittel verhältnismässig wenig toxisch war: 500 mg/kg wurden von den Mäusen symptomfrei vertragen. Nicht nur diese experimentellen Beobachtungen, sondern auch die mit der Arbeit *Domagks* gleichzeitig veröffentlichten klinischen Erfahrungen von *Klee* und *Römer*,<sup>191</sup> ferner *Schreus*,<sup>331</sup> haben auch die Pessimisten überzeugt, dass die Chemotherapie der bakteriellen Infektionen schliesslich geschaffen wurde und die Medizin im Prontosil ein Mittel in die Hände bekam, dessen ätiologische Wirksamkeit alle bisherigen übertrifft. Diese wichtigen Beobachtungen haben zu einer Anzahl von experimenteller und klinischer Arbeiten Anlass gegeben, die noch im selben Jahre zur Widerlegung der Annahme *Domagks* hinsichtlich des Wirkungsmechanismus des Prontosil führten. *Domagk* glaubte nämlich den wirksamen Bestandteil der Verbindung in der mit ihrem Farbstoffcharakter zusammenhängenden Azogruppe gefunden zu haben. Bald hat es sich aber herausgestellt, dass die chemotherapeutische Wirkung nicht auf die erwähnte Gruppe, sondern auf einen anderen Teil des Prontosilmoleküls zurückzuführen ist.

Aus dem Fournauschen Institut haben J. und Mme J. *Tréfouel*, *Nitti* und *Bovet*<sup>361</sup> schon im November 1935 berichtet, dass durch die Diazotierung des p-Aminobenzolsulfonamids, ferner durch Kuppelung verschiedener Phenole und Aniline eine ganze Reihe der wirksamen Azofarbstoffe gewonnen werden kann. Alle Farbstoffe, bei deren Syn-

these vom p-Aminobenzolsulfonamid ausgegangen wurde, erwiesen sich als wirksam, während die aus anderen Ausgangsverbindungen abgeleiteten Azofarbstoffe unwirksam waren. Von dieser Beobachtung veranlasst, haben sie auch das von den Chemikern wohlbekannte, und einfach gebaute, von *Gelmo*<sup>124</sup> bereits 1908 hergestellte p-Aminobenzolsulfonamid erprobt. Entsprechend ihrer Vermutung war diese einfache, farblose Verbindung gegen die Streptokokkeninfektionen der Mäuse und Kaninchen ebenso wirksam, wie ihre verwickelten Azofarbstoffderivate, z. B. das Prontosil. Ihre Beobachtungen wurden kurz darauf von *Goissedet*<sup>125</sup> und seinen Mitarbeitern bestätigt.

Auf Grund dieser Erfahrungen erhebt sich der Gedanke, ob das Prontosilmolekül als solches vielleicht unwirksam sei und erst im Organismus, nach seiner Verwandlung durch Reduktion zum p-Aminobenzolsulfonamid wirke. Dieser Gedanke war um so mehr zu erwägen, als die Spaltung der Azoverbindungen durch Reduktion ein den Chemikern bekannter Prozess war. Die Reduktion des Prontosil geht schon unter der Einwirkung milder Reduzierstoffe vonstatten; so haben 1937 *Bliss* und *Long*<sup>24</sup> gezeigt, dass die Reduktion auch von dem physiologisch wichtigen Cystein in Gang gesetzt wird. Weitere Untersuchungen haben über jeden Zweifel bewiesen, dass nicht das Prontosil selber sondern sein Spaltprodukt wirksam ist. *Fuller*<sup>115</sup> (1937) konnte im Urin und im Blut von Individuen, die mit Prontosil rubrum oder dem ähnlich wirkenden aber leichter löslichen Prontosil soluble (Dinatriumsalz der 4'-Sulfoamido-phenylazo-7-acetyl-amino-oxynaphtalin-3,6-disulfosäure) behandelt wurden, beträchtliche Mengen eines diazotierbaren und nachher mit Thymolgekuppelt ein farbiges Präparat liefernden Stoffes nachweisen. Durch die quantitative Bestimmung dieses Stoffes hat er festgestellt, dass 75% des einverleibten Prontosil unter Reduktion gespalten wird und in dieser Form im Kreislauf strömt bzw. mit dem Urin ausgeschieden wird. Aus dem Urin einer Kranken konnte er nach Verabreichung von 4,8 g Prontosil peroral und 3,0 g Prontosil soluble i. v. 0,8 g p-Aminobenzolsulfonamid isolieren. Dieser Befund beweist, dass die Spaltung des Prontosil tatsächlich im Sinne der Annahme erfolgt. *Barron* und *Jacobs*<sup>9</sup> fanden für das Prontosil bei pH 6,93 ein Reduktionspotential von 0,100—0,01 Volt; demnach kann das Prontosil von zahlreichen Redox-Systemen des Organismus reduziert und in dieser Weise gespalten werden.

Obwohl die obigen Beobachtungen bewiesen haben, dass ein Spaltprodukt des Prontosilmoleküls, das p-Aminobenzolsulfonamid, eine mit der der Muttersubstanz identische Wirkung besitzt, waren sie von dem Gesichtspunkt aus, dass die Prontosilwirkung *allein auf der Abspaltung dieses Stoffes im Organismus fusst*, nicht hinreichend beweiskräftig. Schon die ersten Versuche (*Colebrook* und *Kenny*,<sup>58</sup> *Long* und *Bliss*,<sup>232</sup> *Whitby*,<sup>377</sup> *Gray*<sup>126</sup> seine Mitarbeiter und andere) haben festgestellt, dass Prontosil und p-Aminobenzolsulfonamid bei den mit Streptokokken infizierten Tieren gleich wirksam sind, oder die zweiterwähnte Verbindung vielleicht etwas stärker wirkt, dennoch konnte obige Frage durch diese Versuche nicht entschieden werden. Bei der Prüfung der Frage, welcher von den zwei Stoffen wirksamer ist, ist auch das Molekulargewicht der Stoffe zu berücksichtigen, um so mehr, als das Prontosilmolekül ungefähr

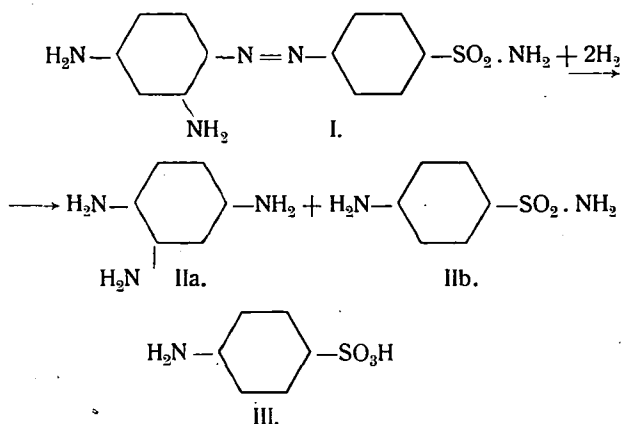
dreimal so gross ist wie das Molekül des p-Aminobenzolsulfonamids. Mehrere Forscher versuchten eben mit Rücksicht auf den letztgenannten Umstand die Frage endgültig zu beantworten. Von den betreffenden Versuchen kommt die grösste Bedeutung mit Rücksicht auf die Zahl der Versuchstiere und die anderen Versuchsbedingungen der Arbeit von *Feinstone, Bliss, Ott und Long*<sup>92</sup> zu. Eine beträchtliche Anzahl von Mäusen haben sie ungefähr mit 500 d. l. m. von hämolytischen Streptokokken intraperitoneal infiziert und die Tiere zum Teil mit  $3 \times 6$  mg p-Aminobenzolsulfonamid, zum Teil mit der molekular-äquivalenten Menge  $3 \times 20,5$  mg Prontosil solubile (parenteral) behandelt. In beiden Gruppen blieb ungefähr der gleiche Hundertsatz der Tiere am Leben: 29% der mit  $3 \times 6$  mg p-Aminobenzolsulfonamid behandelten 150 Mäuse und 33% der Gruppe, die  $3 \times 20,5$  mg Prontosil solubile erhielt. Im Rahmen dieses Versuches wurden 100 Mäuse mit  $3 \times 6$  mg Prontosil behandelt, von diesen gingen 86% ein. Da die mit äquivalenten Mengen behandelten Tiere ungefähr im gleichen Verhältnis am Leben blieben, war das Prontosil zweifelsfrei nur in dem Ausmasse wirksam, wie es auf Grund des von ihm in dem Organismus frei gewordenen p-Aminobenzolsulfonamids zu erwarten war.

1936 haben *Buttle, Gray und Stephenson*<sup>11</sup> festgestellt, dass nicht nur das p-Aminobenzolsulfonamid, sondern die noch einfachere p-Aminobenzolsulfosäure (Sulfanilsäure), diese in der chemischen Industrie häufig verwendete organische Verbindung, gleichfalls chemotherapeutisch wirksam ist. Wenn diese einfachen und längst bekannten Verbindungen wirksam sind, ist es vollkommen unbegreiflich, warum die Medizin auf das erste hochwirksame Chemotherapeuticum so lange warten musste. Eigentlich wurde mit dem Prontosil nicht eine bis dann unbekannte Verbindung von Zauberwirkung entdeckt, sondern die bisher unbekannte Wirkung eines Stoffes und seiner Derivate, die längst im Besitz der Menschheit waren, erkannt und nutzbar gemacht. Dies ändert aber nichts an der Bedeutung der Entdeckung, wir sind sogar der Ansicht, dass die Versäumnis anderer Forscher, die diese Entdeckung Jahre zuvor unterlassen haben (*Heidelberg und Jacobs*<sup>146</sup>), das Verdienst *Domagks* noch mehr steigert.

*Colebrook und Kenny*<sup>58</sup> waren die ersten, die in bezug auf den Wirkungsmechanismus des Prontosil bzw. des p-Aminobenzolsulfonamids eine Entdeckung von ausschlaggebender Bedeutung machten. Wie erwähnt, war in Zusammenhang mit der Prontosilwirkung die Erscheinung besonders auffallend, dass die Streptokokken im Reagenzglas selbst in einer 2% igen Lösung nicht getötet werden. Diese Verfasser haben festgestellt, dass das Prontosil *nicht nur in der Fleischbrühe, sondern auch im menschlichen Serum unwirksam bleibt, wenn es diesen Medien in vitro hinzugefügt wird. Im Gegensatz hierzu konnte das Wachstum der Streptokokken durch das Serum von Prontosilbehandelten stark gehemmt werden.* Im Verlauf ihrer Versuche konnten *Colebrook*<sup>57</sup> und seine Mitarbeiter die wachstumshemmende Wirkung des p-Aminobenzolsulfonamids auf die Streptokokken unter entsprechenden Versuchsbedingungen auch bei direkter Hinzugabe des Mittels zum Blut nachweisen. Der Unterschied zwischen der Wirkung des Prontosil und des p-Aminobenzolsulfonamids erhellt aus ihren folgenden Versuchen: 1 ccm defibriniertes Menschenblut, das p-Aminobenzolsulfonamid in der Konzentration

1:25000 enthält, tötete die hinzugefügten 15000 Streptokokken innerhalb 24 Stunden, während das Prontosil soluble selbst in einer Konzentration von 1:50 unwirksam blieb.

Das Gesagte kurz zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: Das von *Domagk* entdeckte Prontosil rubrum (I) wird im Organismus durch Aufnahme von 2 Mol Wasserstoff in je 1 Molekül p-Aminobenzolsulfonamid (IIb) und 1,2,4-Triaminobenzol (IIa) gespalten. Die erste Verbindung ist in vivo und auch in vitro wirksam, die zweite unter beiden Umständen wirkungslos. Das unzersetzte Prontosil ist wirkungslos, nur im Organismus wird es in eine wirksame Verbindung verwandelt. Die p-Aminobenzolsulfosäure (Sulfanilsäure) (III) hat eine ähnliche aber schwächere Wirkung als die des p-Aminobenzolsulfonamids.



## II. Kapitel.

### Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate in Tierversuchen.

#### 1. Allgemeine Gesichtspunkte.

Die Erörterung dieser von dem experimentellen Gesichtspunkt aus ausserordentlich wichtigen Frage erscheint uns als unerlässlich, und zwar nicht nur darum, weil es sich um die grundlegende Methodik der experimentellen Chemotherapie bakterieller Infektionen handelt, sondern auch deswegen da ohne Kenntnis dieser Frage die theoretische Behandlung des Wirkungsmechanismus nicht möglich bzw. verständlich ist. Wir sind uns darüber klar, dass das diesbezügliche Schrifttum zu umfangreich ist, um es in den Rahmen dieser Monographie in jeder Beziehung einbeziehen zu können, doch war dies keineswegs unsere Absicht. Wir möchten lediglich durch eine entsprechende Auswahl der Literaturangaben die Einsicht in gewisse Einzelheiten des Problems ermöglichen und auf Grund einiger Beispiele auch denen, die sich ohne entsprechende Erfahrungen mit der experimentellen Chemotherapie befassen wollen, einen Wegweiser

bieten. Wir glauben den zweiterwähnten Gesichtspunkt um so weniger vernachlässigen zu dürfen, als eine standard und allgemein anerkannte Wertbestimmungsmethode bisher nicht zur Verfügung steht, weshalb die Frage durch eine einfache Anweisung nicht erledigt werden kann.

Die chemotherapeutische Wirksamkeit der Sulfanilamidderivate wurde bisher gegen die verschiedensten menschen- und tierpathogenen Erreger erprobt. Die grösste Aufmerksamkeit aber wandte sich den Kokkeninfektionen zu. Die Zahl der mit anderen Krankheitserregern ausgeführten Untersuchungen ist verhältnismässig gering. Dementsprechend beziehen sich unsere Ausführungen beinahe ausschliesslich auf die Kokkeninfektionen, vor allem auf die Infektion mit Streptokokken und Pneumokokken.

Folgende Frage wird bei der experimentell-therapeutischen Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate gestellt: *Wie weit kann bei infizierten Tieren der Krankheitsverlauf mit den einzelnen Präparaten beeinflusst werden?* Das Verfahren steht, ähnlich allen biologischen Verfahren, auch unter dem Einfluss zahlreicher, vom Forscher unabhängiger Faktoren. Aus diesem Grunde kann auf die quantitativen Verhältnisse nur auf dem Wege über Vergleichen geschlossen werden. Bei diesen Vergleichen dient zumeist das Sulfanilamid als Standard.

Für die Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate kommen entsprechend dem Krankheitserreger und der zu lösenden Aufgabe verschiedene Versuchstiere in Betracht. In dieser Hinsicht hat man angefangen von den Affen die verschiedensten Tierarten verwandt, in der Praxis aber hat sich die Maus am besten bewährt. Gegen die Tierversuche wird oft eingewendet, dass ihre Verhältnisse von denen des menschlichen Organismus abweichen, weshalb die Versuchsergebnisse in der Klinik nur mit Vorbehalt ausgewertet werden könnten. Die Berechtigung dieser Einwendung wollen wir gerne anerkennen und wir glauben, dass es übertrieben wäre, die chemotherapeutische Wirksamkeit eines Mittels *allein* aus den Tierversuchen zu beurteilen. Andererseits steht es fest, dass der einzige Weg zur erfolgreichen Entwicklung der Chemotherapie über den Tierversuch führt.

Betrachtet man die experimentelle Infektion der Maus mit Strepto-, Staphylo-, Pneumo- und besonders Meningokokken, so fällt der von dem menschlichen abweichende Infektionsverlauf sofort auf: nach subkutaner oder intraperitonealer Einverleibung der entsprechend virulenten Strepto-, oder Pneumokokken kommt es zu einer allgemeinen Infektion und das Tier geht bald an einer Sepsis, meist in 24—48 Stunden — ein, ohne das geringste Zeichen einer natürlichen Immunität aufgewiesen zu haben. Dagegen verläuft die menschliche Infektion — mit seltenen Ausnahmen — in Begleitung zahlreicher defensiven Reaktionen. Die Maus ist also — im Gegensatz zum Menschen — vollkommen anergisch gegen diese Infektionen. Dieser Tatsache aber kommt vom Gesichtspunkt der Chemotherapie, wie es im folgenden gezeigt werden soll, eine nicht geringe Bedeutung zu, da an der Heilung sowohl die humoralen als auch die zellularen Faktoren des Organismus beteiligt sind. In die Rolle der humoralen Faktoren bieten folgende Versuche Einsicht.

Zunächst sollen die Untersuchungen *Loewenthals*<sup>230</sup> besprochen

werden. Er behandelte die infizierten Mäuse kombiniert mit typspezifischem Streptokokkenserum und Sulfanilamid. Die getrennt unwirksamen Dosen beider Mittel waren bei der Kombination auffallend wirksam. Mit der kombinierten Therapie kann man zu einem Zeitpunkt — 18 Stunden nach der Infektion — wenn die obigen Mittel gesondert verabreicht selbst in den höchsten Dosen unwirksam bleiben, noch einen Erfolg erzielen. Ähnliche Beobachtungen machten *Branham* und *Rosenthal*,<sup>33</sup> die das Meningokokkenserum, ferner *MacLeod*,<sup>250</sup> *Miller*,<sup>270</sup> die das Pneumokokkenserum mit Sulfanilamid bzw. Sulfapyridin kombinierten. Über die günstigen Ergebnisse der kombinierten Vakzine-Sulfapyridinbehandlung bei Pneumokokkeninfektionen der Mäuse berichten *MacLean*, *Rogers* und *Fleming*,<sup>249</sup> ferner *Schmith*.<sup>328</sup> In dieser Hinsicht kommt den Versuchen von *Kaufmann* und *Schmith*<sup>182</sup> mit den verschiedenen Salmonellen eine besondere Bedeutung zu. Obwohl die *S. enteritidis* und die *S. cholerae suis* im Reagenzglas gegenüber der Sulfanilamidderivaten sich sehr empfindlich verhielten und auch die *S. typhi murium* sich als mässig empfindlich erwies, konnte eine wesentliche therapeutische Wirkung nur gegen die *S. cholerae suis* erzielt werden. Hingegen war die kombinierte Behandlung mit Vakzine und Sulfapyridin erfolgreich, sogar auch gegen die *S. typhi murium*, die sich durch das Chemotherapeuticum allein kaum beeinflussen lässt. Im Laufe dieser Versuche wurden zwei Gruppen von je 20 Mäusen zweimal mit je 50—100 Millionen vorher auf 100° erhitzten *S. typhi murium* geimpft; nach einer Woche wurden die Tiere infiziert und zur Hälfte mit täglich 30 mg Sulfapyridin behandelt, die andere Hälfte diente als Kontrolle des Erfolges der Vakzinierung. Parallel hierzu wurden ähnliche Versuche mit unvorbehandelten Tieren angestellt. Von 20 mit Vakzine und Sulfapyridin behandelten Tieren blieben 14 am Leben, von 20 nur vakzinierten 3, von 20 nicht vakzinierten nur mit Sulfapyridin behandelten 4, von den überhaupt nicht behandelten Kontrollen nur 1. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten die mit *S. enteritidis* infizierten Tiere selbst unter ähnlichen Versuchsbedingungen nicht erhalten werden. Den Grund des Unterschiedes sehen die Forscher darin, dass auf die Vakzination mit dem typhimurium-Stamm die Mäuse mit der Erzeugung von Antikörper ansprechen, hingegen wird in dem mit *S. enteritidis* vorbehandelten Organismus, wahrscheinlich wegen der ungünstigen Antigenstruktur dieses Erregers, kein Antikörper erzeugt.

Die Annahme, dass bei der Sulfanilamidbehandlung zur Ergänzung der chemotherapeutischen Wirkung eine gesteigerte Ansprechbarkeit bzw. ein gewisser Immunitätszustand des Mäuseorganismus erforderlich ist, wird auch durch andere Tatsachen unterstützt. Zahlreiche Forscher haben beobachtet, dass von den mit Pneumokokken oder Streptokokken infizierten Mäusen die unbehandelten Tiere sehr rasch eingehen, während die mit mässigen Dosen des Chemotherapeuticums behandelten erst später einzugehen beginnen; die Mehrheit der Tiere erliegt am 5.—6. Tage nach der Infektion, später gehen sie immer seltener verloren und von den am 10.—14. Tage noch lebenden gehen nur wenige ein. *Hieraus ist klar ersichtlich, dass die Sulfanilamidwirkung* — wie es auch aus anderen Versuchen hervorgeht — *die Generalisierung der Infektion und hier-*



durch das Eingehen der Tiere verzögert bzw. den Infektionsverlauf derart verlangsamt, dass die Tiere in dieser Zeit endgültig genesen. Vom 7.—14. Tage an, wenn der Ausgang der Infektion so lange hinausgeschoben wird, ist schon eine bedeutende Immunität vorhanden; diesem Faktor dürfte aber vom Gesichtspunkt der endgültigen und restlosen Heilung aus Bedeutung zukommen. Dass *das Chemotherapeuticum die Entwicklung einer Immunität nicht hindert*, erhellt auch aus entsprechenden Versuchen. *Buttle*<sup>39</sup> fand bei den mit Pneumokokken infizierten und durch Behandlung mit 4,4'-Diaminodiphenylsulfon am Leben erhaltenen Mäusen einen beträchtlichen Immunitätsgrad vor. Über ähnliche Ergebnisse ihrer Mäuseversuche berichten auch *Whitby*,<sup>378</sup> ferner *Schmidt* und *Hilles*.<sup>325</sup> Letztere Verfasser machten auch in bezug auf den Zeitpunkt des Immunitätseintrittes und die Dauer der Immunität Erfahrungen. Sie verabreichten den Mäusen intraperitoneal 100 d. l. m. ( $10^{-7}$  ccm Fleischbrühekultur) vom Pneumococcus Typ 1 und behandelten die Tiere mit grossen Sulfapyridindosen. Wurden die am Leben gebliebenen Tiere nach 7—14 Tagen wieder infiziert, so blieben von ihnen 86% am Leben, hingegen nur 6%, wenn die Reinfektion nach 28 Tagen vorgenommen wurde. Sie sind der Ansicht, dass die mit Pneumococcus Typ 1 infizierten und mit Sulfapyridin behandelten Mäuse nur eine vorübergehende Immunität besässen, die aber zur Ergänzung der Chemotherapie für die endgültige Heilung einen wichtigen Faktor darstelle. Von den einschlägigen Beobachtungen seien noch die Ergebnisse von *Schmith*<sup>328</sup> erwähnt. Sie führte bei den mit  $10^{-4}$  ccm Bouillonkultur infizierten und durch energische Sulfapyridinbehandlung erhaltenen Mäusen am 8. Tage des Versuchs eine Reinfektion durch, indem die Tiere zum Teil mit dem homologen Typ, zum Teil mit lebenden zu 7 verschiedenen Typen gehörenden Pneumokokken behandelt wurden. Bei den mit dem homologen Typ infizierten konnte eine ansehnliche Immunität nachgewiesen werden, während von den mit heterologen Typen infizierten nur ein Bruchteil am Leben blieb. Sonach erwies sich die durch Vorbehandlung erworbene Immunität als typenspezifisch.

*MacLeod*<sup>250</sup> misst der nach der Infektion entstehenden Immunität vom Gesichtspunkte der erfolgreichen Chemotherapie — Erhaltung des Lebens der Tiere — eine entscheidende Bedeutung bei. Hierdurch liesse sich die Tatsache erklären, dass gegen gewisse Pneumokokkentypen (z. B. Typ 3) die Sulfanilamide nur einen Partialschutz gewähren. Bekanntlich können die mit Typ 3 infizierten Mäuse — von wenigen Ausnahmen abgesehen — selbst mit der energischsten Sulfanilamidbehandlung nicht gerettet werden. Die Wirkung der Behandlung besteht lediglich darin, dass die behandelten Tiere die unbehandelten überleben und zumeist erst am 4.—6. Tage eingehen. Dagegen sind die mit Typ 1 infizierten Tiere mit der ausreichenden Dosis des entsprechenden Sulfanilamidderivates leicht zu retten. Er will diesen Unterschied dadurch erklären, dass er dem Typ 1 vorzügliche Antigeneigenschaften zuschreibt, während der Typ 3 bekanntlich ein schlechtes Antigen ist. *MacLeod* selbst sieht die schwache Antigenwirkung von Typ 3 auch durch seine eigene Versuchsergebnisse erwiesen; mit einer getöteten Vakzine (0,01 ccm Bouillonkultur) geimpfte Mäuse erlagen schon einer milden Infektion.

Beim ähnlichen Versuch mit Typ 1 ging fast kein einziges Tier ein. Die schwache Antigeneigenschaft des Typ 3 ist übrigens bekannt: durch diesen Stamm liess sich in Kaninchen der Kapselantikörper nur schwer herstellen. Zur Veranschaulichung dieser Verhältnisse sollen noch die Worte von B. White<sup>379</sup> angeführt werden: „Thus, it is known to be more difficult to obtain a potent serum for Type III than for Type II Pneumococcus, and easier to produce serum of higher protective value for Typ I than for Type II“... „Attempts to produce serum effective against Type III pneumococci possessing as they do an unusually large amount of capsular material, have been disappointing.“

Obwohl laut obigem zwischen dem Antigenwert des Pneumococcus und seiner therapeutischen Beeinflussbarkeit ein Parallelismus angenommen werden kann, sind die Einzelheiten dieses Problems noch bei weitem nicht geklärt. Um über die allgemeine Gültigkeit dieses Zusammenhanges zu entscheiden, sind weitere Versuche anzustellen, die ausser auf die erwähnten Umstände auch auf die Sulfanilamidempfindlichkeit der verschiedenen Stämme Rücksicht nehmen.

Auf die Immunität, die sich bei mit Meningokokken infizierten und durch Sulfamethylthiazolbehandlung am Leben Gebliebenen Mäusen entwickelte, liessen meine folgenden Beobachtungen<sup>158</sup> schliessen: 22 Mäuse wurden mit 150 Millionen (1000 d. l. m.) Meningokokken Typ Gordon I, die einer Aszitesagarkultur entnommen in einem 5%-igen Magenmucin suspendiert waren, intraperitoneal infiziert und mit  $5 \times 10$  mg Sulfamethylthiazol behandelt; trotz der Infektion konnten auf diese Weise alle Tiere gerettet werden. Am 12. Tage nach der Infektion erhielten die Mäuse 10 d. l. m. des in Mucin suspendierten homologen Stammes, zugleich wurden auch 10 Kontrolltiere infiziert. Die Kontrollen gingen innerhalb von 48 Stunden ausnahmslos an Meningokokkensepsis ein (die Kokken konnten aus dem Herzblut gezüchtet werden), dagegen wurden von den reinfizierten 22 Tieren nur 2 verloren. Hieraus folgt, dass in den mit Meningokokken infizierten und mit Sulfamethylthiazol behandelten Tieren sich eine ausgeprägte aktive (erworbene) Immunität entwickelt hat. Ich bin jedoch der Ansicht, dass die Mäuse diesen Faktor, d. i. die erworbene Immunität, für den restlosen Erfolg der Sulfanilamidbehandlung (für die Erhaltung ihres Lebens) bei der Meningokokkeninfektion nicht benötigen. Denn im Laufe dieser Meningokokkenversuche wurde beobachtet, dass die Lebensdauer der unbehandelten und der auf unzureichende Weise behandelten Tiere ungefähr die gleiche war. Die Kontrollen gingen innerhalb von 48 Stunden ein, die behandelten Tiere lebten aber kaum einige Stunden weiter, oder sie genasen. Solche Fälle, wie bei den Pneumokokkeninfektionen, wo die infizierten und behandelten Tiere manchmal nach einem 4-6-tägigen Wohlbefinden plötzlich eingingen, kamen hier nicht vor. Die mit Meningokokken (100—1000 d. l. m.) infizierten Mäuse schienen schon in den ersten Stunden nach der Infektion krank, und zwar nicht nur die Kontrollen, sondern auch die behandelten. Der Zustand der behandelten hat sich, sofern sie überhaupt genasen, rasch gebessert, die anderen gingen fast gleichzeitig mit den Kontrollen ein. Demnach kommt es bei der Sulfanilamid-

behandlung der mit Meningokokken infizierten Mäuse *in kurzer Zeit* entweder zu ihrer Heilung oder zu ihrem Tod, weshalb bei der Heilung die nur später eintretende, *erworbene* Immunität keine Rolle spielt. Aus dem Organismus des erfolgreich behandelten Tieres verschwinden die Krankheitserreger ausserordentlich schnell; so konnten die Meningokokken im Organismus der mit 1000 d. l. m. infizierten Mäuse nach 10 Stunden nicht mehr nachgewiesen werden.

Die hier geschilderte Auffassung lässt sich mit der Ansicht *Prooms*,<sup>299</sup> der auf Grund zahlreicher Versuche die Wirkungsunterschiede der Sulfanilamide bei der Meningo- bzw. Streptokokkeninfektion der Maus studierte, gut in Einklang bringen. Nach seiner Ansicht biete das Sulfanilamid gegen die Meningokokken einen viel stärkeren Schutz als gegen Streptokokken. Es sei gar nicht nötig, die Behandlung tagelang fortzusetzen, da der Meningococcus nicht imstande sei, sich in der Maus solche Lokalherde zu schaffen wie der Streptococcus. *Levaditi* und *Vaisman*<sup>210</sup> behaupten nämlich, dass die Streptokokken in der infizierten und mit Sulfanilamid behandelten Maus in der Milz der Tiere selbst am 8. Tage der Infektion noch nachgewiesen werden können und die von hier ausgehende Septikämie nur durch die Dauerbehandlung verhütet werden kann.

Auf Grund obiger Ausführungen ist also die Annahme zulässig, dass bei den Pneumococcus- und Salmonella-Infektionen zur Erzielung einer restlosen chemotherapeutischen Wirkung die von der erworbenen Immunität gebotene Unterstützung erforderlich ist, bei der intraperitonealen Meningokokkeninfektion der Maus aber diese Unterstützung entbehrt werden kann. Allerdings ist hier auch der Umstand zu berücksichtigen, dass die Maus gegenüber der Meningokokkeninfektion — im Gegensatz zu den Pneumokokken — wenig empfindlich ist, da sie über eine erhebliche angeborene Immunität verfügt, weshalb die Infektion mit einer geringen Anzahl von Keimen nur dann gelingt, wenn die natürliche Immunität des Tieres irgendwie, am besten mit Muzin, bekämpft wird. Der Mechanismus der Muzinwirkung ist vorläufig unbekannt, soviel steht aber fest, dass es sich um eine *örtliche und nur vorübergehende Wirkung* handelt. Mangels entsprechender Versuche ist es noch nicht geklärt, welche Bedeutung dieser natürlichen Immunität in dem Erfolg der Sulfanilamidbehandlung zukommt, wenn sie nach örtlichen und vorübergehenden Aufhören allmählich wiederkehrt.

Obwohl ausser den geschilderten auch andere Versuche dafür sprechen, dass es zur Ergänzung der Chemotherapie einer angeborenen oder erworbenen Immunität bedarf, möchten wir nicht verschweigen, dass in bezug auf die Streptokokkeninfektion der Maus diese Beweise vorläufig ausstehen. Ausser den schon zitierten Versuchen *Loewenthals*,<sup>230</sup> die lediglich auf die Bedeutung der passiven Immunität hinweisen, fanden wir im Schrifttum keine einzige beweiskräftige Angabe, im Gegenteil, die Versuche sprechen gegen diese Theorie. Der Widerstand der mit Streptokokken infizierten und mit Prontosil geretteten Mäuse war in den Versuchen von *Levaditi* und *Vaisman*,<sup>215</sup> ferner *Nitti* und *Bovet*,<sup>286</sup> gegen die Reinfektion keineswegs grösser als der normale. Wir möchten aber diesen negativen Versuchen vom Gesichtspunkte des Problems aus keine allzu grosse Bedeutung beimessen, zumal die Voraussetzungen der aktiven

Immunisierung der Mäuse gegen Streptokokken noch nicht genügend bekannt sind.

Obwohl in der Erforschung der chemotherapeutischen Wirksamkeit der Sulfanilamidderivate die Mäuseversuche überwiegen, müssen die Möglichkeiten der Verwendung anderer Tierarten auch kurz geschildert werden. *Domagk*<sup>30</sup> hält die lokale oder generalisierte Streptokokkeninfektion der Kaninchen für geeignet zur Wertmessung der chemotherapeutischen Wirksamkeit. Auch die intradurale Meningokokkeninfektion der Kaninchen eignet sich zu chemotherapeutischen Versuchen. Es kann Versuchsbedingungen geben, unter denen das Meerschweinchen der Maus vorzuziehen ist. Nach *Habs* und *Bader*,<sup>139</sup> ferner *Seaston*,<sup>335</sup> sei die chronische Lymphadenitis der Meerschweinchen, bedingt durch hämolytische Streptokokken Gruppe C, zu chemotherapeutischen Studien gleichfalls geeignet. Bei der Erforschung der Chemotherapie von Gasödeminfektionen ist das Meerschweinchen nach *Schreus*<sup>333</sup> und seinen Mitarbeitern, ferner *Ivánovics*, *Gieszer*, *Eözlös* und *Diczfalussy*,<sup>172</sup> wegen seiner hochgradigen Empfindlichkeit und anderer Gründe das Versuchstier der Wahl.

Von den anderen in Betracht kommenden Versuchstieren empfehlen *Cooper* und *Gross*<sup>272</sup> zur chemotherapeutischen Erforschung der Pneumokokkeninfektionen weisse Ratten. Ihren Vorteil gegenüber der Maus sehen sie darin, dass bei diesem Tier der in Muzin suspendierte *Pneumococcus* Typ 3 bei intratrachealer Einführung nach den Beobachtungen von *Gunn* und *Nungester*,<sup>138</sup> ferner *Nungester* und *Jourdonais*,<sup>291</sup> regelmässig eine lobare Pneumonie hervorruft. Dieses Verfahren wird von *Gross* und *Cooper*<sup>130, 131</sup> auch für die Versuche mit *Pneumococcus* Typ 1 und 2 vorgeschlagen. Diese Infektion eigne sich besonders darum zu chemotherapeutischen Versuchen, weil die Empfänglichkeit der Ratte und der Infektionsverlauf — entgegen der intraperitonealen Mäusesepsis — der menschlichen Krankheit mehr ähnlich sind. Bei den intratracheal infizierten Ratten soll 1. eine Lungenveränderung ähnlich wie beim Menschen auftreten, 2. die Infektion nicht so rapid verlaufen, wie bei den intraperitoneal infizierten Mäusen, so dass die Ratten im Gefolge der Infektion erst am 2.—6. Tage eingehen, 3. ein Teil der Tiere (cca 7—15%) auch spontan heilen.

Diese Umstände dürften mitverursacht haben, dass *Gross* und *Cooper* bei Ratten bessere Erfolge mit Sulfanilamid erzielten als bei Mäusen. Sie konnten die mit *Pneumococcus* Typ 3 intraperitoneal infizierten Mäuse mit Sulfanilamidbehandlung nicht retten, lediglich eine Verlängerung des Lebens wurde erzielt. Dagegen betrug die Letalität der mit dem selben Erreger intratracheal infizierten und sofort in Behandlung genommenen Ratten (14 Tage lang täglich 125 mg) nur 23% gegenüber 86% in der Kontrollgruppe. Die Verfasser betonen, dass diese Ergebnisse mit den am Krankenbett gemachten Erfahrungen erheblich besser übereinstimmen als die der Mäuseversuche.

## 2. Technik der Mäuseschutzversuche.

Hier sollen vor allem die technischen Gesichtspunkte berücksichtigt und die Besprechung der Literaturangaben möglichst vermieden werden. Wegen der Mannigfaltigkeit der Methoden wollen wir vor allem von unseren Erfahrungen ausgehen und die Technik beschreiben, die in den vergangenen Jahren unseren Versuchen zugrunde gelegt wurden. Hier und da können wir nicht umhin, auf Umstände hinzuweisen, die für das Problem wichtig erscheinen, obwohl wir darüber keine eigenen Erfahrungen haben. Im folgenden sollen die einzelnen technischen Fragen in Punkten kurz zusammengefasst besprochen werden.

### a) Unterbringung und Fütterung der Versuchstiere.

Da die chemotherapeutischen Forschungen eine hohe Anzahl von Versuchstieren erfordern, sind nur Wenige in der glücklichen Lage, Mäuse von gleicher Züchtung und Abstammung verwenden zu können. Die von verschiedenen Stellen beschaffenen Tiere können nicht nur wegen der verschiedenen Herkunft, sondern auch wegen der verschiedenen Bedingungen ihrer Fortpflanzung und Aufzucht nicht als biologisch gleichwertig angesehen werden. Zweifels- ohne wird die Empfänglichkeit der Mäuse von den erwähnten Umständen beeinflusst, aber die Bedeutung dieser Unterschiede für die chemotherapeutischen Versuche ist nicht näher bekannt.

Bei uns werden die auf dem Markt gekauften Tiere zunächst in 40—50-er Gruppen 7—10 Tage beobachtet. Geht in dieser Zeit eine Anzahl der Tiere an einer, bei den Mäusen sehr häufigen Paratyphusinfektion ein, oder in einer Weise, dass der Grund des Eingehens nicht ermittelt werden kann, so werden die Tiere zu chemotherapeutischen Versuchen möglichst nicht verwendet. Während der Beobachtung und der Versuchsperiode erhalten die Mäuse folgende Kost: je 250 g feingemahlene Gerste und Mais, 3 g Kochsalz, 7 g Calcium carbonicum praecipitatum und 2 g trockene Bierhefe werden in 1 Liter heissem Wasser vermengt und unter stetem Rühren 20 Minuten gekocht. Nachher werden 50 g Casein und 20 g „Pekk“ (Chinoin, Ujpest) hinzugegeben und gut vermengt. (Pekk ist ein mit bestrahltem Ergosterin durchtränktes pflanzliches Vehikel). Von dieser Nahrung erhalten die Tiere täglich 10—15 g. Der Wassergehalt der Nahrung macht das Darreichen von Trinkwasser überflüssig.

3 Tage vor dem Versuch werden die in der herkömmlichen Weise markierten Tiere zu 5 bis 6 in einen mit Hobelspänen reichlich versehenen und mit Metallnetz bedeckbaren Glasbehälter von 185 mm innerem Durchmesser und 170 mm Höhe verlegt. Diese drei Tage sind nötig um zu beobachten, wie sich die Tiere aneinander gewöhnen. In den Versuchen werden mindestens 17 g wiegende Mäuse verwendet. Um trotz der Entwicklungsunterschiede möglichst einen guten Durchschnitt zu erhalten, werden die Tiere von verschiedenem Gewicht unter die Gruppen so weit als möglich gleichmässig verteilt. Während der Versuche wird die Streu 3-4-täglich gewechselt.

### b) Die zu den Infektionen verwendeten Bakteriumstämme und ihre Virulenz:

Zur Aufbewahrung der Pneumo- und Streptokokkenstämme und Erhaltung ihrer Virulenz wird das sog. „Lyophyl“-Verfahren (Flosdorf und Mudd<sup>103</sup>) angewandt. Die nach Erfrierung getrockneten Bakteriumsuspensionen bleiben in Vacuum sehr lange lebensfähig. Es genügt, Passage und Erfrischung in 6-12-monatigen Abständen vorzunehmen. Während der Versuchsperiode werden die Stämme nach 2—3 Mäusepassagen auf Blutagar gehalten und zur Erhaltung der Virulenz zweiwöchentlich auf eine Maus übertragen.

Nun hat sich die Frage erhoben, welche Stämme zur Wertbestimmung der Sulfanilamide verwendet werden sollen. Am besten entsprechen für Streptokokkenversuche die menschenpathogenen Pyogenesstämmen (nach *Lancefield: A*). Unter diesen befinden sich oft auch mäusepathogene Stämme. Gelegentlich reichen von diesen Stämmen einige Kokken aus, die Maus bei intraperitonealer Einführung zu töten, sofern sie sich durch einige Passagen an die Maus anpassen konnten. Zu Sulfanilamidversuchen wurde auch der Stamm „Richard“ vielerorts verwendet. Dieser Pyogenesstamm wurde im Laboratorium von Prof. *Colebrook* (London) ausgezüchtet.  $10^{-9}$  ccm seiner jungen Bouillonkultur sind für die Maus sicher tödlich. Gegen die Bovinstämme (Gruppe B) kann die Maus auch geschützt werden. Es hat aber den Anschein, dass nicht alle Stämme gleichweise geeignet sind: *Long* und *Bliss*<sup>231</sup> erzielten bei der Infektion mit einem Stamm nur geringe Erfolge mit Sulfanilamid. Die zu verschiedenen akuten Tierinfektionen führenden C-Stämme lassen sich nicht nur bei Mäuse-, sondern auch bei Meerschweinchenversuchen verwenden (*Seastone*<sup>235</sup>).

Die Pneumokokkenstämmen Typ 1, 2 und 3 sind sofort nach ihrer Züchtung oder nach wenigen Passagen hochgradig mäusepathogen. Ihre Virulenz kann durch eine entsprechende Anzahl von Passagen maximal gesteigert werden, wobei unter maximaler oder voller Virulenz die tödliche Wirkung von einigen Kokken bei intraperitonealer Einverleibung zu verstehen ist. Da eine gut gedeihende Bouillonkultur von Pneumokokken mehr als 2 Milliarden Keime pro ccm enthält, kann die Wirkung von  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  ccm schon tödlich sein. Es gibt Typen, wo die Virulenz einiger Stämme selbst durch zahlreiche Passagen nicht auf das Maximum erhöht werden kann. So arbeiteten wir z. B. mit einem Stamm vom Typ 14, dessen kleinste tödliche Menge nach langdauernden Passagen nicht unter  $10^{-2}$ – $10^{-3}$  ccm herabgesetzt werden konnte.

Erheblich schwerer sind die chemotherapeutischen Versuche mit Staphylokokken auszuführen. Aus den Literaturangaben geht hervor, dass die aus Menschen isolierbaren Stämme kaum mäusepathogen sind. Dagegen gelang die Isolierung einiger pathogenen Stämme aus Tieren. Vom Gesichtspunkte solcher chemotherapeutischen Versuche aus ist ein Bovinstamm von Dr. *G. A. H. Buttle* (Beckenham, Kent) besonders beachtenswert. Dieser erwies sich in Magenmazin suspendiert als besonders virulent.

In Zusammenhang mit der Virulenz der bei chemotherapeutischen Versuchen angewandten Stämme sei noch folgendes bemerkt: Unmittelbar nach der Entdeckung *Domagks* berichteten *Nitti* und *Bovet*<sup>285</sup> über die Unwirksamkeit des Prontosil gegen sehr wenig virulente Streptokokkenstämmen. Diese auffallende Beobachtung wurde seitdem auch von anderen Verfassern bestätigt (*Colebrook* und *Kenny*,<sup>58</sup> *Long* und *Bliss*<sup>232</sup> und andere). Anscheinend ist aber dieses Verhalten nur für die wenig virulenten Stämme kennzeichnend, so fand z. B. *Rosenthal*<sup>312</sup> zwischen den hoch- und mittelmässig virulenten Varianten desselben Pneumokokkenstammes keinen Unterschied in dieser Beziehung. Unlängst wurde diese Frage in Zusammenhang mit einem mässig (d. l. m. =  $0,5 \times 10^{-3}$  ccm) und einem vollvirulenten Stamm („Richard“, d. l. m. =  $0,5 \times 10^{-8}$  ccm) von *Fenyvessy*, *Kolozsi* und *Takátsy*<sup>93</sup> studiert. Im Reagenzglas verhielten sich alle drei Stämme gleich empfindlich gegen Sulfanilamid. Trotzdem waren die Heilergebnisse mit Sulfanilamid bei den mit mässig virulenten Stämmen infizierten Tieren besser als bei der Infektion mit dem vollvirulenten Stamm. (Die Infektion erfolgte in allen Fällen mit 100 d. l. m.). Die Verfasser sind der Ansicht, dass zur Wertbestimmung der Sulfanilamide unbedingt hochvirulente Stämme verwendet werden sollen.

Auch wir glauben, dass zur Messung der Sulfanilamidwirkung nur Stämme mit hoher Virulenz bzw. möglichst Vollvirulenz in Frage kommen, finden doch die natürlichen Infektionen auch zumeist mit solchen Stämmen statt. Im Falle von Strepto- und Pneumokokken-

versuchen bereitet diese Bedingung keine besondere Schwierigkeit. Dagegen müssen wir bei Meningo- und Staphylokokkenversuchen von diesen Bedingungen abgehen, da solche Stämme, von denen einige Kökken die Maus zu töten vermögen, nicht immer verwendet werden können.

### c) Die Infizierung der Tiere.

Falls kein besonderer Umstand dagegen spricht, werden die Kokken der Maus intraperitoneal einverleibt. Zur Infektion verwendet man ganz junge in der Wachstumsphase befindliche Bouillonkulturen. Hierdurch kann die vollständige Vitalität und Virulenz der Keime am besten gesichert werden. Die technische Voraussetzung der Züchtung dieser empfindlichen Erreger ist eine besondere Sorgfalt bei der Herstellung der Fleischbrühe. Von diesem Gesichtspunkt aus verdienen die Arbeiten von Wright,<sup>396</sup> ferner O'Meara und Macsween,<sup>392</sup> die dieses Problem systematisch studierten, einer besonderen Aufmerksamkeit. Auch bei uns wurde oft beobachtet, dass die zu Routinezwecken dienende Fleischbrühe sich zur optimalen Züchtung von Pneumokokken und Streptokokken nicht immer eignet. Aus diesem Grund stellen wir eine Herzbrühe her und zwar mit der Modifizierung der Vorschrift des Rockefeller-Institutes wie folgt:

Aus dem Schlachthaus werden möglichst viele Rinderherzen beschafft, von Fett und Bindegewebe sorgfältig gereinigt und fein gemahlen. 500 g Herzbrei werden mit 1 Liter Leitungswasser versetzt und über Nacht bei 4° C in einem Kühlschrank gehalten. Am nächsten Tag folgt Erwärmung auf 60° 30 Minuten lang, Filtrierung durch Flanell unter Auspressung des Restes. Jetzt werden 10 g Pepton Witte und 5 g Kochsalz hinzugefügt, über offener Flamme unter stetem Rühren bis zum Sieden gekocht, durch grobes Filterpapier filtriert, das pH mit n/1 Natronlauge auf 8,2 eingestellt, wieder 5 Min. gekocht und in heissem Zustand durch grobes Filterpapier wieder filtriert. Das Filtrat wird zu 5 ccm in Reagenzgläser oder zu 500 ccm in Kolben verteilt und bei 120° sterilisiert. Das endgültige pH dieser Fleischbrühe ist 7,8.

### Herstellung der zur Infizierung verwendeten Kultur:

An dem Tage vor dem Versuch werden Mäuse mit je 0,5 ccm, der Fleischbrühenkultur des Stammes infiziert und nach 8—10 Stunden in moribundem Zustand mit Chloroform getötet. 1 Tropfen des Herzensblutes wird unter sterilen Kautelen auf Blutagar bzw. 5 ccm Bouillon geimpft. Die Bouillonkultur und das Blutagar werden am anderen Morgen gegen 9 Uhr in einem gefärbten Strichpräparat auf Reinigkeit geprüft. Ist die Bouillonkultur rein, so wird 1 ccm in 5 ccm Bouillon abgeimpft und bis 1 Uhr Nachmittag im Thermostat aufbewahrt. Zu dieser Zeit ist die Kultur schon vollentwickelt und zum Versuch geeignet. Nach wiederholter Prüfung auf Reinheit wird die Kultur mit Fleischbrühe verdünnt (*Salzwasser ist kein geeignetes Verdünnungsmittel!*). Zur Infizierung der Tiere entnimmt man 0,25—0,5 ccm der entsprechenden Verdünnung. Einige Tiere werden zur Kontrolle der Virulenz auch mit stark verdünnten Kulturen geimpft. Im Falle von vollvirulenten Strepto- und Pneumokokkenstämmen reicht die Impfung von je 3 Tieren mit den Verdünnungen  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$  und  $10^{-9}$  aus.

### d) Behandlung der Tiere.

Bei der Wertbestimmung der antibakteriellen und besonders der antitoxischen Sera bereitet die Serumdosierung keine Schwierigkeiten. Gleichzeitig mit der Infektion werden verschiedene Serum-mengen einmal injiziert; dann kann die Serumdosis, die einen

hinreichenden Schutz bietet, einfach ermittelt werden. Bei chemotherapeutischen Versuchen ist die erste Schwierigkeit dadurch gegeben, dass die einmalige Behandlung zur Rettung der Tiere nicht genügt. Die Behandlung muss tagelang fortgesetzt bzw. wiederholt werden. Während dieser Zeit können einzelne Tiere eingehten, weshalb die spätere Behandlung — vom 4.—5. Tage an — nur bei einem Teil des Tierbestandes vorgenommen werden kann. Schon hieraus ist es klar zu sehen, welch grundlegenden Schwierigkeiten Rechnung zu tragen ist, wenn man die Wirkung verschiedener Chemotherapeutica vergleichen will. Die Schwierigkeiten treten noch mehr hervor, wenn auch die sonstigen Umstände wie z. B. Resorptions- und Ausscheidungsverhältnisse der einzelnen Mittel berücksichtigt werden. Obwohl die pharmakologischen Eigenschaften der Sulfanilamidderivate nicht in den Rahmen dieser Arbeit gehören, ist die Besprechung ihrer Resorption und Ausscheidung vom Gesichtspunkte der zu erörternden Probleme aus anscheinend unerlässlich.

Die gegenüber einem idealen Chemotherapeuticum zu stellenden Forderungen lassen sich in einem Satz zusammenfassen: *mit der möglichst kleinsten Menge ist eine gleichmässige und anhaltende Konzentration im Organismus zu erzielen, die für die Wirkung ausreicht und von der toxischen Grenze fern liegt.* Da im Laufe der Wertbestimmungsversuche von der zweiten Bedingung abgesehen werden kann, gestaltet sich das Problem einfacher. Vom technischen Gesichtspunkt aus bedeutet es einen Vorteil, wenn zur Feststellung der Konzentration des Mittels im Organismus nur das Blut untersucht wird. Nach Vorausschickung obiger Ausführungen sollen nun die näheren Einzelheiten der Aufgabe betrachtet werden.

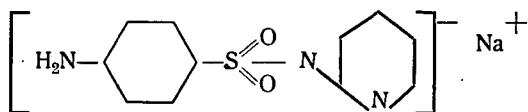
Zu Beginn der Prontosilperiode — nach Herstellung des Prontosil solubile — erschien zur Wertbestimmung die parenterale Anwendung als die einfachste. Bald wurde aber die perorale Verabreichung für besser gefunden, zumal das p-Aminobenzolsulfonamid und seine meisten Derivate sich im Wasser schwer lösen. Wegen ihrer schlechten Löslichkeit arbeiteten einige Forscher, z. B. *Rosenthal* und seine Mitarbeiter, mit öligen Suspensionen. Abgesehen von den technischen Schwierigkeiten dieser Methodik — zur Einverleibung der Ölsuspension ist eine dicke Nadel zu verwenden, dann fließt aber ein Teil der Flüssigkeit durch den weiten Stichkanal wieder heraus — ist gegen diese Methode manches einzuwenden. Nach den Beobachtungen von *Schmith*<sup>328</sup> kann die Konzentration des Mittels im Organismus auf diese Weise kaum beeinflusst werden. In einem Versuch injizierte sie je Mäusen 0,25 bzw. 0,5 ccm einer öligen Sulfapyridinsuspension subkutan, d. h. 50 bzw. 100 mg Substanz. Von der 4. Stunde an bis zum 8. Tage verfolgte sie die Konzentration des Mittels in der Maus. Nach einer statistischen Verarbeitung ihrer Ergebnisse, die von uns vorgenommen wurde, betrug die durchschnittliche Blutkonzentration — auf Grund von je vier an den ersten drei Tagen durchgeführten Bestimmungen — und ihre Standarddeviation während dieser Periode für die mit 50 mg behandelten Tiere  $15,2 \pm 2,7$  mg %, für die mit 100 mg behandelten  $15,7 \pm 2,6$  mg %, also ebenso viel. Nach dem dritten Tag traten offensichtliche Unterschiede auf, indem die Blutkonzentration der mit der niedrigeren Dosis behandelten Tiere schnell abnahm, bei den mit 100 mg behan-



delten dagegen erheblich langsamer. Die Tatsache, dass der Blutspiegel bei der Verwendung der Ölsuspensionen von der Dosis wenig abhängt, erklärt *Schmith* dadurch, dass die Resorption eines Ödepots von dem im Öl enthaltenen Mittel unabhängig vor sich geht. Die intraperitoneale Einverleibung der Ölsuspensionen lässt aber die Mengenunterschiede zur Geltung kommen. *Marshall, Bratton, White und Litchfield*<sup>260</sup> injizierten in die Bauchhöhle der Maus verschiedene Mengen aus einer Ölsuspension von Sulfanilylguanidin. Als die Tiere eingingen, wurden folgende Konzentrationen im Blut ermittelt: nach 0,5 g/kg  $16,3 \pm 6,7$ , nach 1 g/kg  $68,0 \pm 24,2$ , nach 2 g/kg  $113,9 \pm 19$  mg %. Wir halten aber die intraperitoneale Einspritzung von Ölsuspensionen aus verschiedenen Gründen, auf die hier nicht eingegangen werden soll, für unzuweckmässig zur Behandlung der infizierten Tiere.

Zur parenteralen Behandlung mit den Sulfanilamidderivaten kommen auch ihre wasserlöslichen Natriumsalze in Betracht.

Das p-Aminobenzolsulfonamid und seine Derivate bilden — ausgenommen einige, z. B. das Sulfanilylguanidin — in Wasser ausgezeichnet lösliche Natriumsalze. Die einen Säurecharakter besitzenden Derivate, z. B. das Sulfapyridin, erfahren in wässrigen Lösungen folgende Dissoziation:



Das aus der schwachen Säure durch Neutralisierung mit Natronlauge gewonnene Salz dissoziiert schon ziemlich gut, erfährt deshalb eine Hydrolyse, in deren Folge seine Lösung stark alkalisch reagiert (pH: 10,8). Die Lösungen der Natriumsalze von Sulfapyridin und den ähnlichen Verbindungen — z. B. Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol — sind schon gegenüber dem Luftkohlendioxid sehr empfindlich, so dass auf seine Wirkung die freie Säure aus ihrer Lösung ausscheidet. Hierauf ist bei der Herstellung von Lösungen immer Rücksicht zu nehmen. Die Lösung eines Natriumsalzes wird am einfachsten in der Weise hergestellt, dass man m/1000 g Menge der Verbindung (z. B. aus Sulfapyridin 250 mg, aus Sulfamethylthiazol 260 mg) abwägt, mit 1 ccm von *karbonatfreiem* n/1 NaOH versetzt und mit *kohlensäurefreiem* Wasser dem Bedarf entsprechend verdünnt.

Die Natriumsalze der Sulfanilamidderivate werden nach parenteraler Anwendung sehr rasch resorbiert. Diese Methode ist aber zur Bestimmung ihrer chemotherapeutischen Werte wenig geeignet, da die Wirkung wegen der schnellen Ausscheidung nicht anhaltend ist. *van Dyke, Greep, Rake und MacKee*<sup>83</sup> injizierten 1 g/kg aus den Natriumsalzen des Sulfapyridin und Sulfathiazol der Maus subkutan und bestimmten die Konzentration der Mittel im Blute 1;3 und 6 Stunden nach der Injektion. Zu diesen Zeitpunkten fanden sie im Blut 74;69 bzw. 47 mg % Sulfapyridin und 90;69 bzw. 6 mg % Sulfathiazol. Demnach werden diese Mittel nach rascher Resorption und Erreichung von hohen Konzentrationen auch sehr schnell ausgeschieden.

Wenn nun die Kenntnisse von der parenteralen Anwendung zusammengefasst werden sollen, so ist festzustellen, dass diese Einverleibung für die Wertbestimmung aus mehreren Gründen unzuweckmässig ist. Noch weniger lassen sich z. B. die Versuche von *Rosenthal* und *Bauer*<sup>314</sup> auswerten, die in ihrer 1937 erschienenen Arbeit

die Wirkung des in Wasser gelösten Prontosil solubile mit der eines in Ölsuspension verabreichten Sulfanilamid verglichen.

Das Prontosil solubile wurde von *Domagk* und von den Nachprüfern des Mittels zumeist parenteral verabreicht. Später wurde immer mehr die perorale Darreichung bevorzugt, obwohl dies im Falle des Prontosil solubile überhaupt nicht notwendig war. Das Mittel wurde nämlich von *Rosenthal* und *Bauer*<sup>314</sup> peroral wirksamer gefunden als bei parenteraler Einfuhr. Noch mehr musste die orale Darreichung der Wertbestimmung dann zugrunde gelegt werden, als man mit der Prüfung der neueren in Wasser schwerlöslichen Derivate begann.

Die perorale Verabreichung ist bei der Maus ziemlich einfach. Eine auf Tuberkulinspritze angesetzte kurze, dicke, stumpf geschliffene Kanüle, oder eine mild gebogene Glasröhre von 1,5–2 mm Durchmesser, die mittels eines Gummischlauches an der Spritze befestigt wird, lassen sich in die Speiseröhre der Maus leicht einführen und gestatten die perorale Darreichung dieser Mittel in 0,1–1 ccm Volumen. Um die Suspensionen zu stabilisieren, nimmt man die Mittel in 1%-igem Tragacanthaschleim oder in einer 10%-igen Gummiarabicum-Lösung auf. Wichtig ist die feine Pulverisierung des Präparates, die am besten in einer Achat-Reibschale oder mit Hilfe einer Kugelmühle erfolgt. Die gleichmässig feine Pulverisierung des Stoffes ist nicht nur vom Gesichtspunkte der genauen Dosierung wichtig, sondern auch für die Ergebnisse, die von der Verteilung beeinflusst werden. *Mayer*<sup>267</sup> erzielte mit der feinkörnigen Suspension bessere Erfolge als mit der grobkörnigen.

Das p-Aminobenzolsulfonamid und seine Derivate sind im allgemeinen schwerlöslich, ein Parallelismus aber zwischen dem Grad der Löslichkeit und der Geschwindigkeit der Resorption und Ausscheidung lässt sich für diese Verbindungen nicht nachweisen. Letztere Eigenschaften sind charakteristisch für die einzelnen Chemotherapeutica und in dieser Hinsicht weisen sie erhebliche Unterschiede auf. Tabelle 1., die mit der Berücksichtigung der Literaturangaben zusammengestellt wurde, gibt hierüber einige Aufschlüsse.

Zur Erklärung und Ergänzung der Tabelle sei folgendes angeführt:

Nach Einführung von 0,325 g/kg Suspension des in Wasser gut löslichen Sulfanilamid wird in 30 Min. eine beträchtliche Konzentration im Blute erreicht, die aber bald rapid abnimmt. Ähnliche verhält sich der Blutspiegel nach 0,25 g/kg. nach 0,5 g/kg beginnt die Abnahme erheblich später. Interessante Daten wurden über die Resorption des Sulfapyridins erhalten. Dieses schwerlösliche Präparat wird kaum langsamer resorbiert als das verhältnismässig gutlösliche Sulfanilamid. Beachtenswert ist in Zusammenhang mit dieser Verbindung, dass die Blutkonzentration in den ersten vier Stunden des Versuches von der Dosisgrösse auffallend wenig abhängt. Ein Unterschied zwischen den Tieren, die 0,25 g/kg und jenen, die 1–3 g/kg erhielten, liegt sicher schon zu dieser Zeit vor, dieser Unterschied aber ist bei weitem nicht so gross, als man auf Grund der Dosierungsunterschiede erwarten könnte. (S. die Tabelle.) Während die Dosis von 0,5 g/kg auf 3 g/kg also auf das sechsfache erhöht wird, steigt die Blutkonzentration in dem Frühstadium (2. Stunde) von 23 mg % nur auf 30–32 mg % an.

Die Ergebnisse von *Marshall*, *Bratton* und *Litchfield*<sup>259</sup> sind mit dem Gesagten in Einklang und dienen sogar zur Ergänzung obiger Daten. Sie haben festgestellt, dass das peroral in Suspension eingeführte Sulfapyridin zum Anstieg der Blutkonzentration Anlass gibt, aber ohne einen linearen Parallelismus aufzuweisen, ferner, dass die Blutkonzentration über eine gewisse Grenze hinaus weiter nicht gesteigert werden kann. Die erreichbare höchste Konzentration wird mit 50 mg % angegeben, die bei der Fütterung von 6 g/kg und 16 g/kg gleich-

Tabelle 1.

**Konzentration verschiedener Sulfanilamidderivate im Mäuseblut nach einmaliger Einverleibung der Suspensionen.**

Auf Grund der Ergebnisse von verschiedenen Verfassern. Die Werte bedeuten mg % der freien Verbindung

| Präparat                 | Dosis <sup>a</sup><br>g/kg | Konzentration <sup>b</sup> in den ersten Stunden<br>nach der Einverleibung |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |  | Verfasser                |
|--------------------------|----------------------------|--|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|--|--------------------------|
|                          |                            | 1/2  | 1  | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 24 |  |                          |
| Sulfanilamid             | 0,325 <sup>f</sup>         | 26   | 23 | 19 | 15 | 10 | 21 | 4  |    |    |    |    |  | Domagk <sup>80</sup>     |
| "                        | 0,25 <sup>d</sup>          |  | 17 | 13 | 5  |    | 3  |    |    |    |    |    |  | Scudi und                |
| "                        | 0,5 <sup>d</sup>           |  | 30 | 22 | 20 |    | 13 |    |    |    |    |    |  | Graessle <sup>33d</sup>  |
| S. pyridin               | 0,25 <sup>e</sup>          |  | 11 | 23 | 23 |    | 18 |    | 16 |    | 11 |    |  | Schmith <sup>328</sup>   |
| "                        | 0,5 <sup>e</sup>           |  | 13 | 17 | 23 |    | 25 |    | 22 |    | 20 |    |  |                          |
| "                        | 1,0 <sup>e</sup>           |  | 24 | 28 | 28 |    | 31 |    | 29 |    | 25 | 3  |  |                          |
| "                        | 1,5 <sup>e</sup>           |  | 21 | 32 | 33 |    | 35 |    | 35 |    | 37 | 23 |  |                          |
| "                        | 2,0 <sup>e</sup>           |  | 27 | 32 | 33 |    | 30 |    | 32 |    | 36 | 15 |  |                          |
| "                        | 3,0 <sup>e</sup>           |  | 30 | 30 | 36 |    | 39 |    | 37 |    | 35 |    |  |                          |
| " g                      | 0,5 <sup>d</sup>           | 8  | 13 | 15 |    | 12 |    | 8  |    |    |    |    |  | Marshall <sup>260</sup>  |
| " g                      | 6,0 <sup>d</sup>           | 22   | 33 | 42 |    | 45 |    | 42 |    |    |    |    |  | et al.                   |
| "                        | 0,5                        |  | 15 | 16 |    | 13 |    |    |    | 7  |    | 3  |  | Long und                 |
| "                        | 1,0                        |  | 24 |    |    | 21 |    |    |    | 16 |    | 1  |  | Feinstone <sup>233</sup> |
| " g                      | 0,5 <sup>d</sup>           |  | 21 |    | 18 |    |    | 13 |    |    | 8  |    |  | van Dyke <sup>83</sup>   |
| " g                      | 1,0 <sup>d</sup>           |  | 24 |    | 18 |    |    | 21 |    |    | 14 |    |  | et al.                   |
| " g                      | 1,5 <sup>d</sup>           |  | 22 |    | 21 |    |    | 23 |    |    | 23 |    |  |                          |
| S. thiazol <sup>g</sup>  | 0,5 <sup>d</sup>           |  | 12 |    | 10 |    |    | 1  |    |    | 1  |    |  | "                        |
| " g                      | 1,0 <sup>d</sup>           |  | 26 |    | 11 |    |    | 6  |    |    | 2  |    |  |                          |
| " g                      | 1,5 <sup>d</sup>           |  | 27 |    | 14 |    |    | 7  |    |    | 6  |    |  |                          |
| S. methylthiazol         | 0,1 <sup>h</sup>           |  |    | 9  |    | 5  |    | 4  |    |    |    | 0  |  | Barlow und               |
| "                        | 1,0 <sup>h</sup>           |  |    | 12 |    | 11 |    | 10 |    |    |    | 3  |  | Homburger <sup>7</sup>   |
| "                        | 0,5 <sup>d</sup>           |  | 8  | 11 |    | 11 |    |    |    | 9  |    | 4  |  | Diczfa-                  |
| "                        | 2,0 <sup>d</sup>           |  | 11 | 15 |    | 15 |    |    |    | 12 |    | 5  |  | lusz <sup>71</sup>       |
| S. guanidin <sup>g</sup> | 0,5 <sup>f</sup>           | 2  | 5  | 6  |    | 3  |    | 2  |    |    |    |    |  | Marshall <sup>260</sup>  |
| " g                      | 6,0 <sup>f</sup>           | 2  | 5  | 6  |    | 4  |    | 4  |    |    |    |    |  | et al.                   |

**Bemerkungen:**

- Wenn die Daten der Arbeit nicht in g/kg Körpergewicht angegeben wurden, beziehen sich die Werte auf 20 g Mäusegewicht.
- Werte zu ganzen Zahlen abgerundet.
- Durchschnittswerte von 3 Tieren.
- Durchschnittswerte von je 5 Tieren.
- bei je 1 Tier serienweise untersucht.
- Durchschnitt von 2 oder mehreren Tieren.
- Werte von dem in der Arbeit abgebildeten Graphikon mit annähernder Genauigkeit abgelesen.
- Durchschnittswerten von 50—70 Tieren.

**Addendum:**

Löslichkeit der einzelnen Präparate in mg %: nach Vonkennel<sup>368</sup> im m/15 neutralen Phosphatpuffer bei 20° C, nach Marshall<sup>260</sup> und seinen Mitarbeitern (im Klammern) im 37° warmen Wasser; Sulfanilamid 698 (1480), Sulfathiazol 72 (96), Sulfamethylthiazol 22, Sulfapyridin 71 (54), Sulfanilylguanidin (220).

weise erzielt wurde. In einigen Fällen beobachteten sie sogar eine höhere Blutkonzentration nach 6 g/kg als nach 16 g/kg. Dies bezieht sich aber nur auf die Frühperiode; später können schon der Dosis entsprechend erhebliche Unterschiede bestehen.

Über die Resorption des Sulfathiazol, das hinsichtlich Löslichkeit ungefähr dem Sulfapyridin entspricht, stellten van Dyke, Greep, Rake und MacKee<sup>83</sup> folgendes fest: Nach der einmaligen Einführung einer gleichen Dosis von Sulfapyridin und Sulfathiazol beobachtet man Unterschiede im Verhalten der Blutkonzentration. Nach Verabreichung von 0,5–1,5 g/kg wird die höchste Konzentration schon in der 2. Stunde erreicht, nach mittelgrossen Dosen erzielt das Sulfathiazol ein höheres Maximum als das Sulfapyridin. Der Sulfathiazolspiegel nimmt von der 3. Stunde an schnell ab und in der 6. Stunde sind die Werte schon sehr niedrig, das Sulfapyridin hingegen lässt sich selbst in der 9. Stunde noch in einer beträchtlichen Konzentration nachweisen. Somit wird das Sulfathiazol rasch resorbiert und ausgeschieden, während das Sulfapyridin eine träge Resorption aufweist, aber eine beständigere Konzentration gewährt.

Die merkwürdigsten Verhältnisse weist das Sulfanilylguanidin auf. Dieses in Wasser ziemlich gut lösliche Mittel erzielt im Blut selbst nach sehr hohen Dosen (6 g/kg) nur eine niedrige Konzentration, die durch die Höhe der Dosis kaum beeinflusst werden kann. Die Tabelle gibt überdies auch die Resorptionsverhältnisse des Sulfamethylthiazol an.

Zusammenfassend lässt sich nun folgendes feststellen: 1. *Das Ausmass der Resorption dieser Verbindungen steht nicht in geradem Verhältniss mit ihrer Wasserlöslichkeit.* 2. *Nach mittelhohen und hohen Dosen weist die Blutkonzentration in der Frühperiode kaum Unterschiede auf und die für eine Verbindung charakteristische höchste Konzentration kann selbst durch die äusserste Erhöhung der Dosis nicht überschritten werden.* 3. *Werden aus den Suspensionen einmalige niedrige oder mittelgrosse Dosen peroral verabreicht, so äussert sich der Unterschied nur in der Haltbarkeit der Blutkonzentration.*

In Kenntnis der obigen Daten soll nun ein Normalverfahren gesucht werden, das der Wertbestimmung der einzelnen Präparate zugrunde gelegt werden könnte. Zunächst soll festgesetzt werden, dass die für die Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate geeignete einheitliche Technik noch aussteht. *Bestimmt ist die entsprechendste und einfachste Darreichungsform die Suspension, obwohl, wie noch später darauf hingewiesen werden wird, selbst diese Methode zur Wertbestimmung nicht die zweckmässigste darstellt.* Sie hat einerseits den Nachteil, dass auf diese Weise eine gleichmässige Konzentration der Verbindungen im Blute nicht gesichert werden kann, andererseits die Blutkonzentration mit den verschiedenen Dosen nur bis zu einer gewissen Grenze gesteigert wird. Diese Umstände konnten die Forscher vor einigen Jahren noch nicht entsprechend berücksichtigen, oder, sofern sie hierauf Rücksicht nahmen, stand ihnen zur Ausschaltung der Fehlerquellen keine geeignete Methode zur Verfügung. Zur Zeit scheint es am Zweckmässigsten das Mittel zum Futter zu mischen. Mit dieser Frage wollen wir uns mit Rücksicht auf ihre Bedeutung in einem besonderen Kapitel befassen.

Hinsichtlich des Zeitpunktes, wo die Behandlung einsetzt, sowie der Zahl und Häufigkeit der Behandlungen, haben die Forscher äusserst verschiedene Wege eingeschlagen. Die meisten beginnen mit der Behandlung sofort nach der Infektion, dies bedeutet in der Praxis eine halbe Stunde Differenz. Zweifelsohne sind die Erfolge mit dieser Methode erheblich besser, als mit einer später einsetzenden Behand-

lung, obwohl auf die Strepto- und Pneumokokkeninfektion der Mäuse selbst eine nach Stunden beginnende Behandlung noch günstig wirkt. Im allgemeinen wird der Zeitpunkt, nach dem diese Behandlung kaum oder gar keine Aussicht mehr hat, mit der 6.—8. Stunde angegeben. Dies ist leicht zu verstehen, wenn man bedenkt, dass die meisten infizierten Mäuse schon 16—18 Stunden nach der Infektion eingehen oder sich im Sterben befinden. Der Umstand, dass in der Praxis die Chemotherapeutica erst nach dem Auftreten der Infektionerscheinungen verordnet werden, kann — wegen der kurzen Lebensdauer der Versuchstiere — nicht in Betracht gezogen werden, weshalb getrennte Versuche vom Gesichtspunkt der Verhütung bzw. der Heilung aus als sinnlos erscheinen.

Im Schrifttum werden zahlreiche Behandlungsmethoden angegeben. Hier sollen einige beispielsweise besprochen werden.

*Whitby*<sup>378</sup> geht wie folgt vor: er gibt das Mittel sofort, dann in der 7. Stunde nach der Infektion, ferner am 1., 2., 3. und 4. postinfektiösen Tage, mithin sechsmal. Sein Schema oder ähnliche wurden zur Behandlung der Pneumokokkeninfektion der Mäuse auch von anderen Verfassern (z. B. *Ivanovics*,<sup>157</sup> *Gross*, *Cooper* und *Lewis*<sup>132</sup>) gerne verwendet. Zur Erzielung einer gleichmässigen Blutkonzentration werden die Behandlungen zweckmässigerweise öfter als einmal täglich ausgeführt. *Schmidt* und *Hilles*<sup>324</sup> empfehlen zur energischen Sulfapyridinbehandlung der mit den verschiedenen Pneumokokkentypen infizierten Mäuse 20 mg Dosen in Form der nachstehenden Kur: Kur A: in der 2., 8., 14. und 20. Stunde nach der Infizierung, dann 5 Tage hindurch 24stündlich. Kur B: 4 Tage lang 6stündlich, dann weitere 2 Tage 12stündlich. Kur C (sehr energisch): 7 Tage 6stündlich dann noch 3 Tage 12stündlich. In dieser Weise ist die gleichmässige Konzentration ungefähr gesichert, da es zur Erzielung einer beständigen und gleichmässigen Konzentration der Sulfanilamidderivate im Blute, nach *Marshall* und *Cutting*<sup>261</sup> im Falle peroraler Darreichung einer 4stündlichen Dosierung bedürftig ist. Die zu häufige Behandlung stösst aber auf technische Schwierigkeiten, ferner werden die Mäuse von der häufigen Sondierung stark mitgenommen, was für den Ausgang der Infektion kaum belanglos sein dürfte.

#### e) Beobachtung der Versuchstiere.

Für die Auswertung der Versuchsergebnisse sind sorgfältige Beobachtung, Feststellung des Zeitpunktes, in dem das Tier eingeht, ferner die Ermittlung der Todesursache sehr wichtige Faktoren. Zur Feststellung der durchschnittlichen Lebensdauer ist der Zeitpunkt des Eingehens so genau wie möglich zu beobachten. Die ständige Überwachung der Tiere über Tag und Nacht, um die Minute, in der das Tier eingeht, genau aufzeichnen zu können, lässt sich schwer durchführen, es ist dennoch erwünscht, dass in dieser Beziehung auch kleinere Unterschiede als 24 Stunden aufgezeichnet werden. Bei unseren Versuchen wurde die Lebensdauer der Tiere mit einer  $\frac{1}{3}$  Tag-Genauigkeit festgestellt. Diese Aufgabe wurde wie folgt gelöst.

Die Tiere wurden um 2 Uhr nachmittag infiziert und anschliessend (innerhalb 30 Min.) zum ersten Male behandelt. Die nächste Behandlung folgte um 9 Uhr abends. Um 10 Uhr, am Ende der ersten 8-Stundenperiode, um 6 Uhr in der Früh und nachmittags um 2 Uhr, als die zweite bzw. dritte Periode endeten, wurde das Eingehen der Tiere verzeichnet, als ob der Tod der Tiere am Ende des betreffenden Tagdrittels eingetreten wäre. In der Wirklichkeit war die Lebensdauer der Tiere kürzer, als in den Aufzeichnungen, der Fehler lag aber immer

unter 8 Stunden. Während der Arbeitszeit wurden die Tiere häufiger beobachtet und die Leichen aus dem Käfig entfernt, um der Fäulnis und auch dem „Kannibalismus“ vorzubeugen.

Zur Feststellung der Todesursache wurden die eingegangenen Tiere seziert und ihre Organe, vor allem das Herzensblut, bakteriologisch verarbeitet.

Um die hiermit verbundene Arbeit zu vermindern, wurden gewisse Vereinfachungen durchgeführt, allerdings nur in den Fällen, wo die Tiere in der Vorperiode sich sicher als gesund erwiesen hatten. Vor allem haben wir die Kontrolltiere, sofern sie kurz nach der Infektion ungefähr gleichzeitig eingingen, nicht seziert. Bei den verspätet eingegangenen Tieren wurde die Sektion nie unterlassen. Bei den behandelten Tieren haben wir die Sektion und die bakteriologische Untersuchung in den Fällen, wo die Tiere die Kontrollen um einige Tage überlebten und ungefähr zur gleichen Zeit in einer grösseren Anzahl eingingen, nicht vorgenommen, bzw. nur jedes dritte, vierte Tier untersucht. Lebte das behandelte Tier bis zum 6.—7. Tage nach der Infizierung oder noch länger, wurde die Untersuchung nie unterlassen, desgleichen die Untersuchung der Tiere, die im Laufe der Behandlung verletzt wurden oder aus dem Arzneimittel etwas aspirierten. Die kurz nach den Kontrollen eingegangenen Tiere wurden ebenfalls untersucht.

Die Tiere, deren Tod auf eine andere Krankheit, z. B. Paratyphus zurückzuführen war oder bei denen die Todesursache nicht festgestellt werden konnte, wurden bei der Auswertung der Ergebnisse nicht berücksichtigt.

Nach unserer Ansicht werden die mit Strepto- oder Pneumokokken infizierten Tiere am zweckmässigsten 14 Tage lang beobachtet.

Für diese Versuchsdauer sprechen folgende Umstände: Nach 7 Tagen dürfen die Versuche nicht abgeschlossen werden, da Tiere auch nach dieser Frist eingingen. Dies erhellt aus einem unserer Versuche mit *Pneumococcus* Typ 1 (Tabelle 3, S. 31). Hier waren von 87 behandelten Tieren am 7. Tage noch 52 am Leben, am 14. Tage lebten nur noch 45. Ähnliche Erfahrungen machten wir auch im Laufe der Versuche mit anderen Pneumokokkentypen und hämolytischen Streptokokken (Gruppe A und B von Lancefield). Ferner konnten wir feststellen, dass dem Tod nach dem 14. Tag nur äusserst selten die experimentelle Infektion zugrunde liegt. Auch die Beobachtungen anderer Verfasser sprechen für eine 14tägige Versuchsperiode. *Long* und *Bliss*<sup>232</sup> fanden unter ihren mit Protosil und Sulfanilamid behandelten Mäusen keine einzige, die nach dem 14. Tage im Gefolge der Streptokokkeninfektion zugrunde gegangen wäre. *Litchfield*, *White* und *Marshall*<sup>222</sup> haben in einer ihrer Arbeiten die Häufigkeit des Eingehens von 1123 Mäusen, die mit verschiedenen Mitteln behandelt waren, graphisch dargestellt. An der Kurve kann abgelesen werden, dass die meisten Tiere vor dem 7. Tage eingingen, obwohl spärliche Todesfälle bis zum 14. Tage vorkamen. Von diesem Zeitpunkt an wurden kaum einige Tiere verloren. *Schmidt* und *Hilles*<sup>324</sup> verloren von 308 mit verschiedenen Pneumokokkentypen infizierten und mit Sulfapyridin energisch behandelten Mäusen an den 1.—5. Tagen 13, an den 6.—10. Tagen 72, an den 11.—15. Tagen 34. Zwischen dem 16. und 30. Beobachtungstag wurde kein Tier mehr verloren, Ähnliche Ergebnisse verzeichneten an *Raiziss*<sup>304, 305</sup> und seine Mitarbeiter.

Eine über 14 Tage dauernde Versuchsperiode ist aus mehreren Gründen nicht günstig. Abgesehen davon, dass die Tiere auch weiter beobachtet und gepflegt werden müssen, kann der Umstand, dass in dieser Periode Tiere an interkurrenten Krankheiten eingingen, sehr störend wirken. Mit der Ausschliessung dieser Tiere nimmt der Versuchstierbestand ab. Eine längere Beobachtungszeit ist auch aus dem Grunde nicht erwünscht, weil die später zu besprechende „14tägige maximale Lebensdauer“ vom Gesichtspunkt der Auswertung der Ergebnisse den wahren Verhältnisse am nächsten steht.

### 3. Methoden zur Vergleichung der Wirkung der Präparate und Auswertung der Ergebnisse.

Der Inhalt dieses Punktes lässt sich am besten auf Grund einiger Versuche besprechen. Diese Methode erleichtert die Veranschaulichung der praktischen Gesichtspunkte und bietet zugleich eine Übersicht aller Probleme, die bei der Beurteilung der Wirkung von Sulfanilamidderivaten zu berücksichtigen sind. Die im folgenden beschriebenen Versuche werden zum Teil aus unseren bereits erschienenen Arbeiten zitiert, die meisten aber werden an dieser Stelle zum ersten Male veröffentlicht.

#### a) Orientierende Versuche.

Ist nur die Frage zu beantworten, welche von mehreren Präparaten wirksamer, weniger wirksam oder wirkungslos sind, so behandelt man am einfachsten identisch infizierte Mäuse mit der gleichen gegebenen Menge der fraglichen Verbindungen. Zu diesen Versuchen ist die Dosis der Sulfanilamidderivate so zu wählen, dass die Verbindung, die der Vergleichung als Grundlage dient, — zumeist das Sulfanilamid — den Tieren nur einen mittelmässigen Schutz gewähren soll, da auf diese Weise auch die Wirkung der stärker oder schwächer wirkenden Präparate zur Geltung kommen kann. Hinsichtlich der Dosis kann höchstens eine Orientierung gegeben werden, da ihre Grösse von der Art des Erregers, der Empfindlichkeit des Stammes, der Schwere der Infektion, dem Zeitpunkt des Behandlungsanfanges usw. gleichweise abhängt. Obwohl der Einfluss dieser Umstände nur auf Grund von Vorversuchen erwogen werden kann, möchten wir einige Daten, denen zum Teil unsere zum Teil in der Literatur erschienene Erfahrungen zugrunde liegen, hier mitteilen.

Im Institut haben *Diczfalusy* und *Eöhlös*<sup>72</sup> 19 Mäuse mit 500—1000 d. l. m. des hämolytischen Streptokokkenstammes „Richard“ intraperitoneal infiziert und 4 Tage mit zweimal subkutan verabreichten 2,5 mg Sulfanilamid behandelt. Von den Tieren lebten am Ende des Versuches noch 16. Diese Dosierung und Behandlung ist zweckmässig, wenn es sich um die Erprobung eines voraussichtlich schwächeren Präparates als das Sulfanilamid handelt. Erwartet man aber eine stärkere Wirkung, so ist diese Dosis unzureichend, die Behandlung ist mit niedrigeren Dosen (cca 1,5 mg) durchzuführen. In den Pneumococcusversuchen hat sich die perorale Darreichung von Suspensionen bewährt, die meist nach dem Schema von *Whitby* ausgeführt wurde. Für Versuche mit *Pneumococcus* 1 oder 7 gibt man nach dem obigen Behandlungsschema Dosen zu 10 mg. Massive Infektionen mit diesen Typen oder mildere mit den Typen 2,3 und 5 erfordern Dosen von 20—25 mg. Unter den Meningokokkenstämmen befinden sich zahlreiche, die gegenüber den Sulfanilamidderivaten empfindlich sind. Darum genügen oft bei Versuchen mit diesem Erreger ganz niedrige Dosen (2—3 mg).

Zur Veranschaulichung der orientierenden Versuche eignet sich sehr gut der nachstehende Versuch,<sup>158</sup> der von mir mit dem *Meningococcus* Typ *Gordon I* vorgenommen wurde.

Die d. l. m. des wiederholt passierten Stammes betrug in Muzin 150.000—200.000 Kokken. Aus seiner Agarkultur wurde eine 5%-ige Muzinsuspension hergestellt und am 5. 12. 1939 Mäusen intraperitoneal einverleibt (0,5 ccm). 1/2, 3, 6 und 20 Stunden nach der Infektion erhielten die Tiere je 1 mg subkutan von den Natriumsalzen der in Tab. 2. verzeichneten Präparate.

Tabelle 2.

*Schutzwirkung verschiedener Sulfanilamid-Natriumsalze bei intraperitoneal mit Meningokokken infizierten Mäusen.*

| Präparat           | Einverleibung<br>(s. c.) | Zahl der<br>Tiere | am Leben geblieben |    |
|--------------------|--------------------------|-------------------|--------------------|----|
|                    |                          |                   | Zahl               | %  |
| (Kontrolle)        | —                        | 12                | 0                  | 0  |
| Sulfanilamid       | 4 × 1 mg                 | 22                | 7                  | 32 |
| Sulfapyridin       | "                        | 24                | 10                 | 42 |
| Sulfamethylthiazol | "                        | 28                | 20                 | 72 |

Wie ersichtlich, konnten mit dem als Grundlage der Vergleichung dienenden Sulfanilamid 32 %, mit Sulfapyridin 42 %, mit Sulfamethylthiazol 72 % der Tiere gerettet werden.

Es fragt sich nun, ob der beobachtete Unterschied — mit Rücksicht auf die geringe Zahl der Tiere — für diese Präparate typisch oder lediglich durch den Zufall bedingt ist. Zu diesem Zweck wurden die gewonnenen Daten der *Pearson*-schen  $\chi^2$ -Probe unterzogen (die ausführliche Anwendung der Formel ist auch im Werk von *Pearl*<sup>296</sup> zu finden). Hieraus hat sich für den Unterschied zwischen der Sulfanilamid- und der Sulfapyridingruppe ein  $\chi^2$ -Wert von 0,52 ergeben. Dies bedeutet, dass die beobachtete Verteilung von zwei in vollkommen identischer Weise wiederholten Versuchen einmal allein durch den Zufall bedingt sei kann. Demnach kann der Unterschied nicht verwertet werden. Der Unterschied zwischen der Sulfanilamid- und der Sulfamethylthiazolgruppe ist aber zweifellos significant:  $\chi^2 = 10,2$ . Diese Zahl bedeutet nicht weniger, als dass der Versuch mehrere Hundert Male wiederholt werden müsste, um die beobachtete Verteilung allein als Folge des Zufalles beobachten zu können. Bei den Meningokokkenversuchen darf die Lebensdauer der Tiere im Sinne des Kap. II, Pt. 1. ausser acht gelassen werden, da die Lebensdauer der Kontrolltiere und der trotz der Behandlung eingegangenen voneinander kaum abweichen.

In bezug auf die Wirksamkeit der untersuchten Sulfanilamidderivate lässt sich auf Grund des obigen Versuches folgendes feststellen: mit der subkutanen Verabfolgung der Natriumsalze konnte die schnelle, gleiche und restlose Resorption der Präparate gesichert werden, es steht also fest, dass die verabreichte Menge ihre Wirkung entfalten konnte. Da die Injektionen in der kritischen, unmittelbar auf die Infektion folgenden Periode in verhältnismässig kurzen Abständen wiederholt wurden, war die Konzentration der Präparate im Blut — wenigstens während dieser Periode — beinahe gleich und beständig. Obwohl die Ausscheidung der Mittel rasch erfolgt sein dürfte, war ein wesentlicher Konzentrationsunterschied im Gefolge der häufigen Behandlungen zwischen den einzelnen Präparaten kaum vorhanden. Zwar war die Wirkung des Sulfanilamid und des Sulfapyridin in diesem Versuch ungefähr gleich, doch ist das zweite Mittel mit Rücksicht auf sein anderthalbfach grösseres Molekulargewicht als anderthalbfach wirksamer anzusehen, da die Zahl seiner eine identische Wirkung ausübenden Moleküle selbstredend niedriger war. Dasselbe gilt auch vom Sulfamethylthiazol, dessen Molekulargewicht noch grösser als das des Sulfapyridin ist; überdies war diese Verbindung im Versuch erheblich wirksamer als das Sulfapyridin, weshalb anzunehmen wäre, dass die Wirksamkeit seines Moleküls die des Sulfanilamidmoleküls mehrfach übertrifft.

Im folgenden mit *Pneumococcus* Typ 1 vorgenommenen Versuch war der chemotherapeutische Wert der einzelnen Präparate wegen mehrerer Umstände schwerer zu beurteilen als im obigen Beispiel.



Mit der Bouillonkultur des vollvirulenten *Pneumococcus* No. 103 vom Typ 1 ( $0,25 \times 10^{-6}$  ccm = cca 1.000 d. l. m.) wurden aus 10–12 Tieren bestehende Gruppen infiziert und die einzelnen Gruppen nach dem Schema von *Whitby* insgesamt 6-mal mit je 10 mg des in 1%-igem Tragacanthaschleim suspendierten Präparates (Sulfanilamid, Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol, Sulfapyridin) peroral behandelt. Die Versuche wurden zweimal, am 28.6 und am 14. 7. 1939 unter völlig identischen Umständen wiederholt ausgeführt. Die einzeln beobachteten Ergebnisse der zwei Untersuchungen samt ihren Gesamtergebnissen wurden in Tabelle 3. aufgestellt. Über den zeitlichen Verlauf des Eingehens der bei den zwei Versuchen angewendeten Tiere gibt Tabelle 4. Aufschluss.

Tabelle 3.

*Mäuseschutzversuch mit Pneumococcus Typ 1.*

Infektion: 1000 d. l. m.

| Präparat           | Versuchsbeginn     | Zahl der Tiere |            |             | Durchschnittliche Lebensdauer der verendeten Tiere | Lebensdauer |         | Prigge-Index |
|--------------------|--------------------|----------------|------------|-------------|--|-------------|---------|--------------|
|                    |                    | am Anfang      | am 7. Tage | am 14. Tage |  | max. 7      | max. 14 |              |
| Kontrolle          | 28.6.1939          | 6              | 0          | 0           | 1,66   | 1,66        | 1,66    | 60,2         |
|                    | 4.7.1939           | 8              | 0          | 0           | 1,28   | 1,28        | 1,28    | 83,2         |
|                    | Durchschnittswerte | 14             | 0          | 0           | 1,47   | 1,47        | 1,47    | 73,6         |
| Sulfanilamid       | 28.6.1939          | 10             | 3          | 2           | 3,37   | 4,10        | 5,50    | 26,8         |
|                    | 4.7.1939           | 11             | 4          | 3           | 4,25   | 5,00        | 6,33    | 18,9         |
|                    | Durchschnittswerte | 21             | 7          | 5           | 3,81   | 4,56        | 6,00    | 22,6         |
| Sulfathiazol       | 28.6.1939          | 10             | 7          | 5           | 5,66   | 6,13        | 9,86    | 9,9          |
|                    | 4.7.1939           | 12             | 7          | 7           | 3,73   | 5,63        | 9,77    | 11,1         |
|                    | Durchschnittswerte | 22             | 14         | 12          | 4,70   | 5,85        | 9,79    | 10,6         |
| Sulfamethylthiazol | 28.6.1939          | 10             | 8          | 7           | 5,66   | 6,76        | 10,50   | 5,7          |
|                    | 4.7.1939           | 12             | 8          | 7           | 4,53   | 5,65        | 10,51   | 9,6          |
|                    | Durchschnittswerte | 22             | 16         | 14          | 4,95   | 6,16        | 10,50   | 7,8          |
| Sulfapyridin       | 29.6.1939          | 10             | 7          | 7           | 5,11   | 6,43        | 11,3    | 6,2          |
|                    | 4.7.1939           | 12             | 8          | 7           | 6,00   | 6,41        | 10,66   | 7,8          |
|                    | Durchschnittswerte | 22             | 15         | 14          | 5,65   | 6,42        | 10,97   | 7,1          |

Aus Tab. 3. lässt sich feststellen, dass sich die Ergebnisse der zwei Versuche nicht wesentlich von einander unterscheiden. Die geringe Abweichung in der Zahl der eingegangenen Tiere und ihrer Lebensdauer dürfte durch Zufall bedingt sein. Solche geringe Unterschiede sind um so weniger zu beachten, als ähnliche mit einer derart

Tabelle 4.

*Chronologische Reihenfolge des Eingehens der mit Pneumococcus  
Typ 1 infizierten und behandelten Tiere.*

| Präparat         | Zahl der<br>Tiere | Tag des Eingehens |    |    |    |    |    |    |    |    | am Leben geblieben<br>an 14. sten Tag |      |
|------------------|-------------------|-------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|---------------------------------------|------|
|                  |                   | 1.                | 2. | 3. | 4. | 5. | 6. | 7. | 8. | 9. | Zahl                                  | %o   |
| Kontrolle        | 14                | 2                 | 12 |    |    |    |    |    |    |    | 0                                     | 0    |
| Sulfanilamid     | 21                |                   | 1  | 5  | 6  | 1  | 1  | 2  |    |    | 5                                     | 23,8 |
| Sulfathiazol     | 22                |                   |    | 1  | 6  | 1  |    | 1  |    | 1  | 12                                    | 54,5 |
| Sulfäthylthiazol | 22                |                   |    |    | 4  | 1  |    | 3  |    |    | 14                                    | 63,6 |
| Sulfapyridin     | 22                |                   |    |    | 2  | 3  |    | 2  |    | 1  | 14                                    | 63,6 |

geringen Zahl von Tieren durchgeführten Versuche auch bedeutendere Unterschiede aufweisen können.

Aus den Daten von Tabelle 4. lässt sich der Gang des Versuches rekonstruieren. Die Wirkung der einzelnen Präparate kommt in der Lebensdauer der Tiere und in der Zahl der erhaltenen zum Ausdruck. Bei der Auswertung der Ergebnisse sind beide Umstände zu berücksichtigen.

Wird das Leben der Tiere durch die Behandlung nur verlängert, aber nicht gerettet, so schliesst man auf die Wirksamkeit aus der durchschnittlichen Lebensdauer. Unter Beachtung der statistischen Gesichtspunkte kann diese Methode zur Beurteilung der chemotherapeutischen Wirksamkeit geeignet sein. Bleibt aber ein beträchtlicher Teil der Tiere infolge der Behandlung am Leben, so kommt der durchschnittlichen Lebensdauer der eingegangenen vom Gesichtspunkte der Auswertung keine grosse Bedeutung zu, denn es kann vorkommen, dass die durchschnittliche Lebensdauer einer energisch behandelten und trotzdem eingegangenen Gruppe kürzer ist als die der anderen, weniger energisch behandelten. Zur Erklärung dieses scheinbaren Widerspruches ist zunächst auf die Empfindlichkeitsunterschiede der Tiere hinzuweisen, weshalb sie auf dieselbe chemotherapeutische Wirkung nicht in gleicher Weise ansprechen. Das Leben der *Widerstandsfähigsten* rettet man evtl. mit einem milden chemotherapeutischen Eingriff, während die *mässig* oder *sehr* wenig widerstandsfähigen trotz der Behandlung verloren gehen. Demnach ist das Schicksal der in die zweite und in die dritte Gruppe gehörenden Individuen identisch, hinsichtlich der Lebensdauer weisen sie aber Unterschiede auf: die mässig widerstandsfähigen leben länger als die widerstandsfähigen, weshalb der Durchschnitt sich als günstiger erweisen kann, als in den Fällen, wo die energische Behandlung auch die mässig widerstandsfähigen Individuen rettet. Hieraus folgt, dass der Hundertsatz der durch die Behandlung geretteten Tiere und die durchschnittliche Lebensdauer der eingegangenen nicht immer in einem engen Parallelismus stehen. Um den Wert der Behandlung aus diesen zwei Daten richtig beurteilen zu können, müssen diese zwei verschiedene Faktoren irgendwie „auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden.“ Betrachtet man diese Aufgabe mit dem Auge des Mathematikers, so kann man sich die Lebensdauer des geretteten Tieres im Verhältnis zur Lebensdauer des eingegangenen als unendlich denken. Wird aber die Lebensdauer des geretteten Tieres als unendlich lang betrachtet, so kann kein arithmetischer Mittelwert errechnet werden. Um diese Schwierigkeit auszuschalten, bezeichnet man — auf Grund von empirischen Daten, entsprechend dem Charakter der einzelnen Infektionen — den nächsten Termin als Grenze, nach dessen Ablauf infolge der Infektion kein

Tier mehr eingeht. Die Feststellung dieses Termins kann aber nur mit einem gewissen Fehler stattfinden. Im Zusammenhang mit der Beobachtungsdauer wurde erwähnt, dass die überwiegende Mehrheit der behandelten Tiere spätestens in der zweiten Woche eingeht und nach diesem Termin Todesfälle nur ausnahmsweise vorkommen. Wird nun die Beobachtungsgrenze noch mehr, z. B. bis zum 28. Tag hinausgeschoben, so kann die wirkliche Lebensdauer auch der Tiere beobachtet werden, die als seltene Ausnahmen gelten. Dieses Hinausschieben der Versuchsfrist würde zur Folge haben, dass die Lebensdauer der geretteten Tiere mit einem längeren Zeitraum figurieren wird, als die Frist, vor deren Ablauf das Eingehen der Tiere — abgesehen von den wenigen Ausnahmen — beendet ist. Da dieser Zeitpunkt praktisch am Ende der zweiten Woche eintritt, haben wir die Lebensdauer der geretteten als Maximum mit 14 Tagen gerechnet — unbekümmert um die Ausnahmefälle — und den Durchschnitt auf dieser Grundlage ermittelt. Bei der Errechnung des Durchschnittes werden also zu der Summe der Lebensdauer eingegangenen Tiere je 14 Tage pro gerettetes Tier hinzugegeben, und der erhaltene Betrag wird durch die Zahl der am Versuch beteiligten Tiere dividiert. Die so errechnete Zahl wurde von uns „Lebensdauer max. 14“ genannt. Selbstverständlich ist dieser Wert nur ein Index, der sich für arithmetische Berechnungen nicht eignet. Wir glauben aber, dass diese mit dem 14tägigen Termin errechnete Lebensdauer die wahren Verhältnisse getreuer darstellt als die von *Whitby*<sup>378</sup> verwendete ähnliche Ziffer, die auf einer 7tägigen Beobachtung fusst. Dieser Termin ist nach unserer Ansicht zu kurz gemessen; in der zweiten Woche fallen noch zahlreiche Tiere der Infektion zum Opfer, weshalb ein auf dieser Grunlage errechneter Index die Verhältnisse nicht wahrheitsgemäss darstellt.

Der von *Prigge*<sup>298</sup> vorgeschlagene Index, die Absterbegeschwindigkeit, gestattet das Ausserachtlassen der sich auf die Lebensdauer beziehenden empirischen Daten. Der Index wurde vom Verfasser zur Auswertung der chemotherapeutischen Versuche bei Tuberkulose eingeführt und von seinen Mitarbeitern<sup>4</sup> auch bei den Pneumokokkenversuchen herangezogen. Der Begriff „Absterbegeschwindigkeit“ ergibt sich aus dem hundertfachen reziproken Wert der in Tagen ausgedrückten Überlebensdauer:

$$A = \frac{100}{U}$$

Lebt das Tier nach der Infektion nur 1 Tag, so ist  $A = 100$ , Lebt es  $\frac{1}{2}$  Tag, so ist  $A = 200$ , bei einer Überlebensdauer von 50 Tagen ist  $A = 2$  usw. Für die geretteten Tiere ist  $A = 0$ , weil die Lebensdauer theoretisch als unendlich betrachtet werden kann. Selbstverständlich kann auch dieser Index zu arithmetischen Zwecken nicht verwendet werden.

Jetzt wollen wir auf die Frage zurückkommen, welche Rückschlüsse der besprochene Versuch in bezug auf den chemotherapeutischen Wert der einzelnen Präparate gestattet. Am Ende des Versuches (am 14. Tage) lebten von den mit Sulfanilamid behandelten Tieren nur 5, während in den Gruppen der mit den drei anderen Präparaten behandelten Tiere von je 22 in der einen Gruppe 12, in den zwei anderen je 14 Tiere gerettet werden konnten. Der Wirkungsunterschied zwischen Sulfanilamid und den anderen Präparaten scheint schon auf Grund dieser Zahlen auffallend. Dass der beobachtete Unterschied nicht auf Zufall zurückzuführen ist, erhellt aus der  $\chi^2$ -Probe. Der Wert von  $\chi^2$  beträgt, auf Grund des Unterschiedes der Sulfanilamid- und der Sulfamethylthiazolgruppe errechnet, 6,9. Dies bedeutet, dass der Unterschied unter 100 Experimenten nur einmal zufallsbedingt sein dürfte. So lässt sich die Rolle des Zufalles mit grosser Wahrscheinlichkeit ausschliessen. Die drei anderen Mittel weisen Unterschiede auf, deren Bedeutung nicht besonders gross ist: der Unterschied zwischen Sulfathiazol bzw. Sulfamethylthiazol und Sulfapyridin ergibt einen  $\chi^2$ -Wert von 0,272, weshalb die beobachtete Verteilung als identisch anzusehen ist.

Die Wirksamkeitsunterschiede gehen aus den Indexen „Lebensdauer max. 7“, „Lebensdauer max 14“ und dem *Priggeschen* Index gleicherweise hervor. Auch hier erscheint ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Sulfanilamid und den drei anderen Präparaten, während letztere nur unwesentlich von einander abweichen. Da diese Zahlen zu entsprechenden statistischen Berechnungen nicht herangezogen werden können, *lässt es sich nur auf Grund unseres Eindrucks feststellen, dass die Wirkung des Sulfapyridin und Sulfamethylthiazol ungefähr gleich ist, während das Sulfathiazol etwas schwächer wirkt als die zwei anderen.* Somit weisen, obwohl zwischen den drei Mitteln ein statistisch nachweisbarer Unterschied auf Grund der Zahl der überlebenden Tiere nicht beobachtet werden konnte, die ermittelten Indexzahlen doch darauf hin, dass sich das Sulfathiazol unter den gegebenen Versuchsbedingungen als ein schwächeres Chemotherapeuticum erwies, als das gleichwirksame Sulfapyridin und Sulfamethylthiazol.

Unsere Beobachtungen lassen sich mit den ähnlichen mit *Pneumococcus* Typ 1 angestellten Versuchen anderer Verfasser gut in Einklang bringen. *Barlow* und *Homburger*<sup>7</sup> behandelten mit 100 d. l. m. intraperitoneal infizierte Mäuse peroral mit den Suspensionen von Sulfapyridin und verschiedenen Thiazolderivaten des Sulfanilamid. Sie haben auf Grund der Ergebnisse, die bei aus 40–50 Mäusen bestehenden Gruppen gewonnen wurden, festgestellt, dass die gleichen Dosen von Sulfapyridin und Sulfamethylthiazol den Tieren ungefähr den gleichen Schutz gewähren. Dagegen war das Sulfathiazol, obwohl seine Dosis um 25% höher war, etwas schwächer als die zwei anderen Mittel. Dass das in Suspension peroral eingeführte Sulfathiazol gegen die *Pneumokokken* Typ 1 etwas schwächer als das Sulfapyridin wirkt, geht auch aus den Versuchen von *MacKee*<sup>247</sup> und seinen Mitarbeitern klar hervor.

#### b) *Bestimmung der Wirksamkeit der Präparate durch vergleichende Titrierung.*

Auf Grund obiger Versuche erhält man nur auf die Frage Antwort, in welcher Reihe die geprüften Mittel hinsichtlich Wirksamkeit nacheinander folgen. Aus der Anwendung einer gewissen Dosis kann nicht auf die quantitativen Verhältnisse gefolgert werden. Um auch diese kennen zu lernen, bedarf es der Vergleichung der Wirkung von verschiedenen Dosen. Für die Versuche, die auch die quantitativen Verhältnisse berücksichtigen, sind nachstehende Beispiele aufschlussreich.

Am 15., 17. Mai und 24. Juni 1939 wurden Gruppen von 6–12 Mäusen mit der Bouillonkultur des *Pneumococcus* No. 103 vom Typ 1 infiziert und mit verschiedenen Dosen von Sulfanilamid und Sulfathiazol behandelt. Die Präparate wurden in *Tragacanthaschleim* suspendiert peroral, nach dem *Whitbyschen* Schema eingeführt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 5. ersichtlich.

Auf Abb. 1. werden die in der Tabelle aufgestellten Ergebnisse graphisch dargestellt.

Auf Grund der Tabelle und der graphischen Abbildung lässt sich über den Wert der zwei Präparate folgendes sagen:

Der verwendete Stamm war vollvirulent, indem 75% der Tiere, die mit  $0,5 \times 10^{-9}$  ccm seiner Bouillonkultur geimpft wurden, eingingen. Bei der Keimzählung wurden in obiger Bouillonmenge 1–3 Kokken gefunden. Demnach wäre eine stärkere Verdünnung kaum imstande gewesen, die Tiere regelmässig zu töten.

Tabelle 5.

*Vergleichende Titrierung des Sulfathiazol und Sulfanilamid bei den mit Pneumococcus Typ 1 intraperitoneal infizierten Mäusen.*

(Summierung der am 15. 5. 1939, 17. 5. 1939 und 24. 6. 1939 ausgeführten Versuche.)

| Die Infektion<br>(ccm Bouillon-<br>kultur) | Die Behandlung               | Zahl der Tiere | am Leben<br>geblieben |    | Durchschnittliche<br>Lebensdauer der<br>verendeten Tiere | Lebensdauer<br>max. 14, | Prigge-Index |
|--|------------------------------|----------------|-----------------------|----|--|-------------------------|--------------|
|  |                              |                | Zahl                  | %  |  |                         |              |
| $0,5 \times 10^{-9}$                       | (Kontrolle)                  | 8              | 2                     | 25 | 1,6  | 4,7                     | 50,0         |
| $0,5 \times 10^{-8}$                       | "                            | 16             | 2                     | 13 | 1,6  | 3,1                     | 57,0         |
| $0,5 \times 10^{-7}$                       | "                            | 16             | 0                     | 0  | 1,3  | 1,3                     | 79,0         |
| $0,5 \times 10^{-6}$                       | "                            | 14             | 0                     | 0  | 1,4  | 1,4                     | 73,6         |
| $0,5 \times 10^{-4}$                       | "                            | 40             | 0                     | 0  | 1,1  | 1,1                     | 90,1         |
| $0,5 \times 10^{-4}$                       | Sulfanilamid $6 \times 5$ mg | 16             | 0                     | 0  | 3,9  | 3,9                     | 28,0         |
| "  | " $6 \times 10$ mg           | 24             | 2                     | 8  | 4,5  | 5,3                     | 22,1         |
| "  | " $6 \times 20$ mg           | 40             | 7                     | 18 | 6,3  | 7,6                     | 14,3         |
| "  | S. thiazol $6 \times 5$ mg   | 16             | 0                     | 0  | 4,1  | 4,1                     | 31,0         |
| "  | " $6 \times 10$ mg           | 39             | 5                     | 13 | 4,3  | 5,6                     | 24,2         |
| "  | " $6 \times 20$ mg           | 35             | 22                    | 63 | 5,9  | 11,0                    | 6,3          |
| "  | " $6 \times 30$ mg           | 30             | 24                    | 80 | 6,3  | 12,5                    | 3,2          |
| "  | " $6 \times 40$ mg           | 14             | 12                    | 86 | 7,8  | 13,2                    | 1,9          |

Diese Menge ist also die kleinste tödliche Dosis. Die zur Vergleichung der chemotherapeutischen Mittel dienenden Mäuse erhielten 100.000 d. i. m. Wie ersichtlich, haben sich die mit 5 und 10 mg Sulfanilamid bzw. Sulfathiazol behandelten Tiere ungefähr *gleichweise* verhalten. Wird auch der weitere Verlauf der Wirksamkeitskurven berücksichtigt, so hat man den Eindruck (s. Abb.), dass das Sulfathiazol selbst bei der Anwendung der Dosen von 5 und 10 mg etwas günstiger abschneidet. Dies lässt sich aber nur auf Grund der Lebensdauerkurven oder der Überlebenskurven feststellen, während der *Priggesche* Index gerade das Gegenteil zu beweisen scheint: bei der Verabreichung von geringen Dosen soll das Sulfanilamid besser wirken. (Der *Priggesche* Index ist eine Zahl, deren Grösse sich umgekehrt wie die Wirksamkeit verhält). Diese paradoxe Erscheinung, ferner andere hier nicht zu erörternde Gründe, schliesslich theoretische Erwägungen haben uns überzeugt, dass sich der *Priggesche* Index zur Auswertung der Pneumokokkenversuche weniger eignet als die mit einem 14tägigen Maximalwert errechnete Lebensdauer.

Der Unterschied zwischen der Sulfanilamid- und Sulfathiazolwirkung beginnt von der 20 mg Dosis aufwärts offensichtlich zu werden. Leider können vom Sulfanilamid höchstens 30 mg verabreicht werden, da schon diese Dosis stark toxisch wirkt. Die die Sulfathiazolwirkung darstellende Lebensdauerkurve hat einen merkwürdigen Verlauf: zwischen 10 und 20 mg wird sie plötzlich steil, dann weist sie einen der echten Parabel entsprechenden Verlauf auf. Diese Aenderung lässt sich an der die Sulfanilamidwirkung darstellenden Lebensdauerkurve nicht beobachten, es fragt sich aber, ob diese Wendung bei höheren Dosen nicht eingetreten wäre. Vom Sulfanilamid steht fest, dass selbst seine höchste tolerierte Dosis nur eine unbedeutende chemotherapeutische Wirkung besitzt. Die Lebensdauer der Tiere war im Falle der Pneumokokkeninfektion Typ 1 verlängert, aber nur wenig Tiere konnten mit dem Mittel gerettet werden.

Das Sulfanilamid war gegen Pneumokokken auch in den Versuchen von *Buttle*<sup>41</sup> und Mitarbeitern, *Rosenthal*,<sup>312</sup> *Cooper*, *Gross* und *Mellon*,<sup>60</sup> <sup>63</sup> *Whitby*,<sup>378</sup>

Long und Mitarbeitern<sup>235</sup> ferner in unseren eigenen<sup>157</sup> nur wenig wirksam. Die Pneumokokkeninfektion der Mäuse wurde lediglich so weit beeinflusst, dass die Tiere etwas länger lebten als die Kontrollen; höchstens ein kleiner Bruchteil von ihnen bleibt am Leben. Sonach stimmen die Ergebnisse unserer Versuche mit den Literaturangaben gut überein.

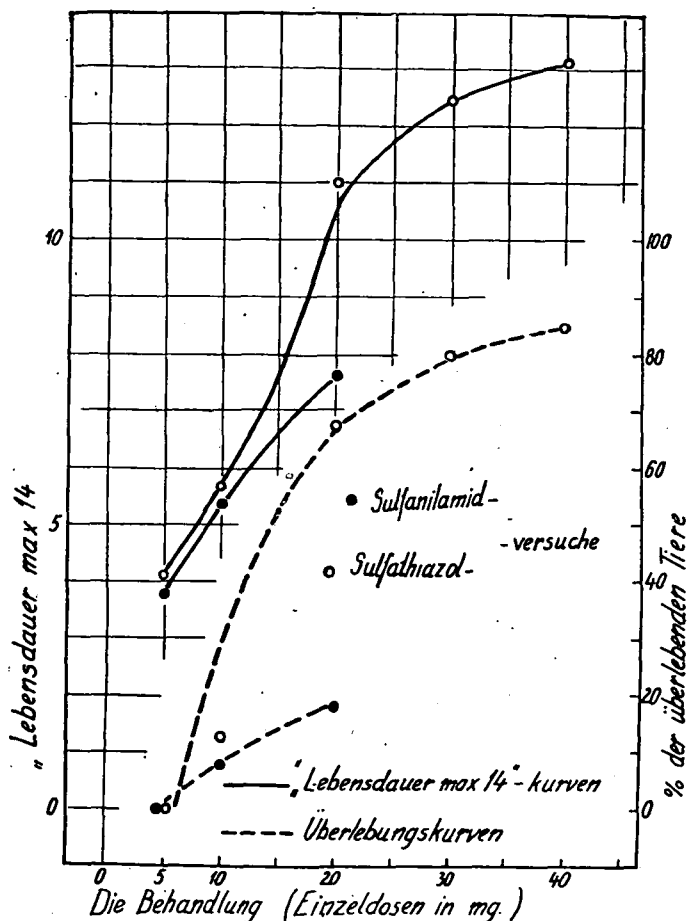


Abb. 1.

Hundertsätze der mit 100.000 d.i. m. des Pneumococcus Typ 1 infizierten und mit Hilfe des Sulfanilamid oder Sulfathiazol am Leben erhaltenen Tiere und die Werte der „Lebensdauer max 14.“

Der eigenartige Verlauf der mit Sulfathiazol erzielten Lebensdauerkurve lässt den Gedanken auftauchen, dass die chemotherapeutische Wirkung des Mittels im Falle von niedrigen Dosen auf einem anderen Wege zur Geltung kommt als bei Dosen über 20 mg. Wir glauben, dass es sich um einen scheinbaren Unterschied handelt, der dadurch bedingt sein dürfte, dass die Verbindung *entsprechend ihren Einzeldosen* eine auch verhältnismässig verschieden hohe und anhaltende Blutkonzentration zustande bringt. Wie aus Tabelle 1. ersichtlich, ist der Sulfathiazolgehalt des Blutes nach der Dosis 0,5 g/kg (10 mg pro Maus) ziemlich niedrig (höchstens 12 mg %), auch diese nimmt schnell ab. Die Dosis von 1 g/kg (20 mg pro Maus),

*bei deren Verabreichung die chemotherapeutische Wirkung des Präparates sprunghaft ansteigt, gibt zu einer beträchtlich höheren Blutkonzentration Anlass als es auf Grund der 0,5 g/kg Dosis erwartet werden könnte.* Diese Dosis führt zu einem Blutspiegel von 26 mg %, überdies sinkt dieser Spiegel erheblich langsamer als nach 10 mg. Die Dosis von 1,5 g/kg = 30 mg beeinflusst die maximale Konzentration im Blute kaum mehr, die erreichte Konzentration hält aber länger an als nach niedrigeren Dosen. Stellt man nun die chemotherapeutische Wirkung der Sulfathiazoldosen den Angaben über die Resorption des Mittels gegenüber, so fällt die Tatsache auf, dass *bei der Steigerung der Dosis von 10 auf 20 mg sowohl die Konzentration des Präparates im Blute als auch die Stärke seiner chemotherapeutischen Wirkung sprunghaft erhöht werden.* Jenseits von dieser kritischen Aenderung des Kurvenverlaufes hat die weitere Erhöhung der Dosis nur eine allmähliche Steigerung der Blutkonzentration und des Schutzes zur Folge. Dieser Parallelismus ist ein gutes Beispiel für die enge Beziehung, die zwischen der Wirkung der Chemotherapeutica und ihrer Resorption bzw. Ausscheidung besteht. Hier sei wieder einmal darauf hingewiesen, dass den eigentümlichen Resorptions- und Konzentrationsverhältnissen, die für jedes Präparat mehr oder weniger kennzeichnend sind, vom Gesichtspunkte der chemotherapeutischen Wirksamkeit aus eine sehr grosse Bedeutung zukommt. Aus Tab. 1. ersieht man, dass mit der Erhöhung der Sulfanilamiddosen die Höhe seiner Blutkonzentration und die Dauer der gesteigerten Konzentration gleichmässig ansteigen. Die Wirksamkeit des Präparates steigt ebenso gleichmässig an (Abb. 1.). Ferner ersieht man, dass, obschon 0,5 g/kg (10 mg pro Maus) eine höhere und anhaltendere Konzentration zur Folge hat als die doppelte Sulfathiazolmenge, letzteres Mittel doch energischer wirkt als die gleiche Menge Sulfanilamid.

Will man nun die Frage beantworten, wie vielmal wirksamer das Sulfathiazol als das Sulfanilamid ist, so ist folgendes zu berücksichtigen: Von dem Sulfanilamid konnten wegen seiner Toxizität Dosen über 20 mg nicht verabfolgt werden. Dieser Umstand bedeutet eine besondere Schwierigkeit für die Antwort, da zur Vergleichung aus den erörterten Gründen nur 20 mg oder höhere Dosen von Sulfathiazol in Betracht kommen. Wenn man jetzt von der Lebensdauerkurve abliest, wie viel mg Sulfathiazol erforderlich sind, eine gleiche Wirkung wie 20 mg Sulfanilamid zu erzielen, lässt sich feststellen, dass diese Dosis ungefähr 14–14,5 mg. beträgt. Das Mittel erscheint als etwas stärker wirksam, wenn der Berechnung die Kurven der geretteten Tiere zugrunde gelegt werden: in diesem Fall würden 20 mg Sulfanilamid ungefähr 10 mg Sulfathiazol entsprechen. Angenommen, dass die den fehlenden Sulfanilamidversuchen entsprechende Kurve ähnlich wie die bereits vorhandene Strecke verläuft, wird zur Erzielung der gleichen Wirkung durchschnittlich die zweifache Menge Sulfanilamid wie die Sulfathiazoldosis erfordert. Nimmt man auch noch auf das Verhältnis der Molekulargewichte der zwei Präparate Rücksicht (250:170), so ergibt sich, dass sich das Sulfathiazol im Versuch als dreimal stärker als das Sulfanilamid erwies.

Die geschilderten Verhältnisse beziehen sich nur auf den Fall, wenn die Infizierung, wie im obigen Versuch, mit 100.000 tödlichen

Dosen erfolgt. Bei leichteren Infektionen verschieben sich die Verhältnisse zugunsten des wirksameren Mittels. Vergleicht man diesen Versuch mit einem in Tab. 3. enthaltenen, bei dem die Infektion mit 1000 d. l. m. desselben Pneumococcus Typ 1 vorgenommen wurde, wird sofort klar, dass diese mildere Infektion von 10 mg Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol oder Sulfapyridin erheblich besser beeinflusst wird. Die Tatsache, dass dieselbe Behandlung bei einer milden Infektion wirksamer ist als bei einer schweren, erscheint als selbstverständlich und es ist sogar erstaunlich, dass es sich nicht immer so verhält. So lässt sich dies z. B. in den mit Pneumococcus Typ 2 ausgeführten in Tab. 6. zusammengefassten Versuchen nicht nachweisen.

Tabelle 6.

*Vergleichende Titrierung des Sulfanilamid, Sulfathiazol und Sulfapyridin den mit Pneumococcus Typ 2 intraperitoneal infizierten Mäusen.*

(Summierung der am 3. 3. 1939 und 8. 5. 1939 ausgeführten Versuche.)

| Die Infektion<br>(ccm Bouillon-<br>kultur) | Die Behandlung |                  | Zahl der Tiere | am Leber<br>geblieben |    | Durchschnittliche<br>Lebensdauer der<br>verendeten Tiere<br>(in Tagen) | Lebensdauer<br>max 14 <sup>4</sup> |
|--|----------------|------------------|----------------|-----------------------|----|--|------------------------------------|
|  |                |                  |                | Zahl                  | %  |  |                                    |
| $0,3 \times 10^{-9}$                       | (Kontrolle)    |                  | 8              | 6                     | 75 | 1,5  | —                                  |
| $0,3 \times 10^{-8}$                       | "              |                  | 10             | 0                     | 0  | 1,4  | 1,4                                |
| $0,3 \times 10^{-7}$                       | "              |                  | 15             | 0                     | 0  | 1,6  | 1,6                                |
| $0,3 \times 10^{-6}$                       | "              |                  | 8              | 0                     | 0  | 1,1  | 1,1                                |
| $0,3 \times 10^{-4}$                       | "              |                  | 31             | 0                     | 0  | 1,1  | 1,1                                |
| $0,3 \times 10^{-4}$                       | S. amid        | $6 \times 5$ mg  | 17             | 0                     | 0  | 3,2  | 3,2                                |
| "  | "              | $6 \times 10$ mg | 16             | 0                     | 0  | 3,9  | 3,9                                |
| "  | "              | $6 \times 20$ mg | 15             | 0                     | 0  | 5,3  | 5,3                                |
| "  | S. thiazol     | $6 \times 5$ mg  | 17             | 0                     | 0  | 3,2  | 3,2                                |
| "  | "              | $6 \times 10$ mg | 16             | 0                     | 0  | 5,4  | 5,4                                |
| "  | "              | $6 \times 20$ mg | 14             | 1                     | 7  | 6,0  | 6,6                                |
| "  | "              | $6 \times 31$ mg | 12             | 3                     | 25 | 6,0  | 8,0                                |
| "  | "              | $6 \times 50$ mg | 8              | 2                     | 25 | 6,5  | 8,4                                |
| "  | S. pyridin     | $6 \times 5$ mg  | 8              | 0                     | 0  | 4,3  | 4,3                                |
| "  | "              | $6 \times 10$ mg | 12             | 0                     | 0  | 3,3  | 3,3                                |
| "  | "              | $6 \times 20$ mg | 8              | 2                     | 25 | 6,6  | 8,5                                |
| $0,3 \times 10^{-6}$                       | S. amid        | $6 \times 5$ mg  | 12             | 0                     | 0  | 3,0  | 3,0                                |
| "  | "              | $6 \times 10$ mg | 12             | 0                     | 0  | 3,3  | 3,3                                |
| "  | "              | $6 \times 20$ mg | 12             | 0                     | 0  | 5,8  | 5,8                                |
| "  | S. thiazol     | $6 \times 5$ mg  | 12             | 1                     | 8  | 3,0  | 3,8                                |
| "  | "              | $6 \times 10$ mg | 12             | 0                     | 0  | 5,1  | 5,1                                |
| "  | "              | $6 \times 20$ mg | 12             | 2                     | 17 | 5,5  | 7,1                                |



Wie ersichtlich, konnte nach der Infektion mit diesem Typ nur ein geringer Bruchteil der Tiere gerettet werden. Ferner lässt es sich auf Grund der Lebensdauerkurven feststellen, dass der gewährte Schutz schwächer ist als bei *Pneumococcus* Typ 1. Infolge des milderen Anstieges der Lebensdauerkurven kann am Abschnitt zwischen den Dosen von 10 und 20 mg die sprunghafte Änderung des Schutzes nicht beobachtet werden (Abb. 2).

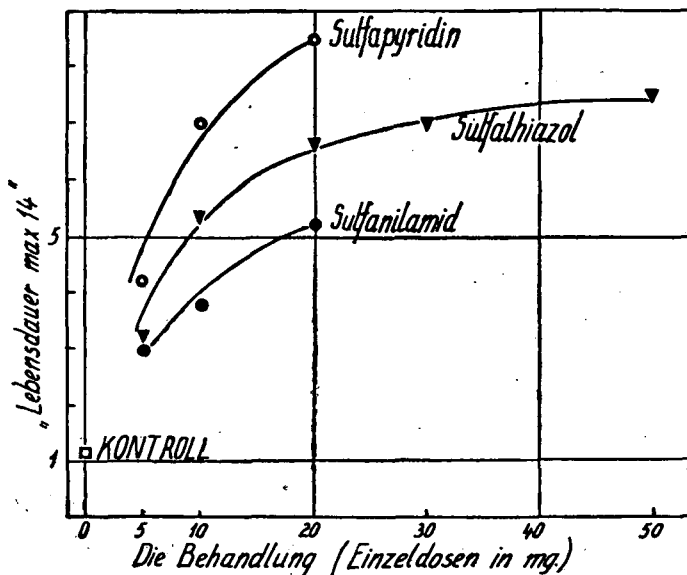


Abb. 2.

Werte von „Lebensdauer max 14“ der Tiergruppe die mit 10.000 d. l. m. *Pneumococcus* Typ 2 infiziert und mit verschiedenen Präparaten behandelt wurden.

Die Kurven der Abb. 2. lassen in bezug auf die Wirkung der einzelnen Mittel folgende Verhältnisse erkennen: bezeichnet man die Sulfapyridinwirkung mit 1, so beträgt die Wirkung des Sulfathiazol 0,6, die des Sulfanilamid 0,33.

Auch die Infektion mit Pneumokokken Typ 3 ist schwer zu beeinflussen. Von den in Tabelle 7. befindlichen 86 Tieren konnte nur eine einzige Maus gerettet werden. Die Wirkung der Präparate äußert sich allein in der Verlängerung der Lebensdauer.

Auf die Unterschiede, die in Zusammenhang mit den verschiedenen Pneumokokkentypen beobachtet werden können, möchten wir unter Berufung auf einige Literaturangaben noch im folgenden hinweisen. Nach Schmidt und Hilles<sup>32a</sup> könne ein wesentlicher Anteil der mit Pneumokokken Typ 1 und 7 infizierten Tiere mit Sulfapyridinbehandlung am Leben erhalten werden. Am schwächsten sei die Infektion mit den Typen 2, 3 und 8 zu beeinflussen, während auf die Typen 4, 5, 6, 9, 22, 29, usw. eine mässige Wirkung zur Geltung komme. Infektionen mit Typ 1 oder 7 lassen sich auch von Sulfamethylthiazol gut beeinflussen (Ivanovics<sup>157</sup>), die mit Typ 2 und 3 erheblich weniger. Im Falle der letzterwähnten Typen ist der Behandlungserfolg auch von der Massivität der Infektion unabhängig. Hier wollen wir noch einige diesbezügliche Beobachtungen Schmiths<sup>32a</sup> zusammenfassen: Von den Mäusen, die mit 100 d. l. m. des *Pneumococcus* Typ 1 infiziert und mit 3×40 mg Sulfapyridin behandelt werden, bleiben 30–60% am

Tabelle 7.

**Vergleichende Titrierung des Sulfanilamid, Sulfathiazol bei mit *Pneumococcus Typ 3* intraperitoneal infizierten Mäusen.**

(Summierung der am 17. 3. 1939 und 27. 6. 1939 ausgeführten Versuche.)

| Die Infektion<br>(ccm Bouillon-<br>kultur) | Die Behandlung              | Zahl der Tiere | am Leben<br>geblieben |    | Durchschnittl.<br>Lebensdauer der<br>verendeten Tiere | Lebensdauer<br>max. 14 " |
|--|-----------------------------|----------------|-----------------------|----|---|--------------------------|
|  |                             |                | Zahl                  | %  |   |                          |
| $0,5 \times 10^{-9}$                       | (Kontrolle)                 | 7              | 1                     | 14 | 1,4   |                          |
| $0,5 \times 10^{-8}$                       | "                           | 6              | 0                     | 0  | 1,4   | 1,4                      |
| $0,5 \times 10^{-7}$                       | "                           | 6              | 0                     | 0  | 1,2   | 1,2                      |
| $0,5 \times 10^{-6}$                       | "                           | 8              | 0                     | 0  | 1,5   | 1,5                      |
| $0,5 \times 10^{-4}$                       | "                           | 16             | 0                     | 0  | 1,2   | 1,2                      |
| $0,5 \times 10^{-4}$                       | S. amid $6 \times 10$ mg    | 15             | 0                     | 0  | 4,1   | 4,1                      |
| "  | " $6 \times 20$ mg          | 15             | 0                     | 0  | 5,6   | 5,6                      |
| "  | S. thiazol $6 \times 10$ mg | 19             | 0                     | 0  | 4,6   | 4,6                      |
| "  | " $6 \times 20$ mg          | 18             | 0                     | 0  | 5,3   | 5,3                      |
| "  | " $6 \times 30$ mg          | 19             | 1                     | 6  | 7,7   | 8,4                      |

Leben, nach 10.000 tödlichen Dosen hingegen nur 10—30% Bei energischerer Behandlung war dieser Unterschied noch auffallender. Dagegen konnte sie die mit Typ 3 infizierten Mäuse weder durch Aenderung der Infektionsmasse noch durch abwechselnde Dosierung am Leben erhalten. Die Versuche mit Typ 7 ergaben in dieser Hinsicht wieder auffallende Unterschiede. Bei einem Versuch injizierten *Cavalli* und *Magni*<sup>52</sup> den mit  $10^{-2}$ — $10^{-9}$  ccm *Pneumococcus Typ 1* infizierten Mäusen 0,6 mg Sulfapyridin subkutan. Die Lebensdauer der mit verschiedenen Mengen infizierten Tiere wies einen regelmässigen Zusammenhang mit der Menge der einverleibten Keime auf, so dass der Zusammenhang zwischen dem harmonischen Durchschnitt der Lebensdauer und dem Logarithmus der injizierten Kokkenzahl in Form einer linearen Funktion ausgedrückt werden konnte.

#### 4. Neue Gesichtspunkte bei der Wertbestimmung der Chemotherapeutica.

Zur Zeit der Entdeckung der Sulfanilamidderivate hatte es den Anschein, als ob die vergleichende Untersuchung der Wirksamkeit der einzelnen Verbindungen keine besondere Aufgabe bedeute. Bald kam es aber in dieser Hinsicht infolge sorgfältig und mit grosser Umsicht ausgeführter Untersuchungen zu einer Enttäuschung. Man fand, dass die Entscheidung darüber, welches von zwei Mitteln das wirksamere sei, keine einfache Aufgabe darstellt, besonders wenn die Wirkungsunterschiede nicht wesentlich sind. Die Wirkung von zwei hinsichtlich ihrer physikalischen Eigenschaften stark abweichenden Mitteln wie Benzylsulfanilamid und Sulfanilamid lässt sich nach *Lockwood* und *Robinson*<sup>229</sup> sehr schwer vergleichen. Das Benzylsulfanilamid (Proseptasin) wurde 1937 von *Whitby*<sup>277</sup> als gleich-

wertig mit dem Sulfanilamid befunden; die Beweise dieser Behauptung standen im Jahre 1940 noch immer aus. *Lockwood* und *Robinson* fanden, entsprechend den Versuchsbedingungen, einmal das eine, ein andermal das andere Mittel für wirksamer; schliesslich haben sie festgestellt, dass der Wertbestimmung nie ein einziger Versuchstyp, sondern die Ergebnisse, die unter einer ständigen Abänderung der Versuchsbedingungen gewonnen werden, zugrunde gelegt werden sollen.

*Buttle*,<sup>44</sup> ferner *Fourneau*<sup>107</sup> und seine Mitarbeiter, haben 1937 gleichzeitig festgestellt, dass das von *Fromm* und *Wittmann*<sup>114</sup> noch im Jahre 1908 hergestellte 4,4'-Diaminodiphenylsulfon wertvolle chemotherapeutische Eigenschaften besitzt. Seitdem gelangten sämtliche Prüfer zu dem Ergebnis, dass dieser Stoff erheblich energischer wirkt als das Sulfanilamid, in bezug auf seinen relativen Wert aber wurden sehr abweichende Meinungen geäussert. Es wurde von *Fourneau*<sup>106</sup> und seinen Genossen für zwanzigmal, von *Buttle*<sup>40</sup> und seinen Mitarbeitern hundertmal, von *Bauer* und *Rosenthal*<sup>13</sup> dreissigmal, von *Raiziss*<sup>303</sup> und seinen Genossen zehnmal wirksamer als das Sulfanilamid befunden. Auch das Sulfapyridin hat in dieser Beziehung zu Meinungsverschiedenheiten Anlass gegeben. Nach *Whitby*<sup>378</sup> seien 2 mg des Präparates bei Pneumococcusinfektion der Mäuse ebenso wirksam wie 10 mg Sulfanilamid. Andere fanden, dass das Mittel kaum, wieder andere, dass es viel wirksamer sei als das Sulfanilamid. Wir verweisen in dieser Beziehung noch auf einen unserer besprochenen Versuche, wo das Mittel auf die Pneumokokken Typ 2 dreimal energischer wirkte als das Sulfanilamid.

Die auffallenden Meinungsunterschiede in bezug auf den chemotherapeutischen Wert der Verbindungen werden von *Marshall*, *Litchfield* und *White*<sup>262</sup> durch zwei Umstände erklärt: 1. Identische Dosen der einzelnen Mittel haben verschiedene Blutkonzentrationen zur Folge. 2. Weder die perorale noch die subkutane Verabreichung vermag eine gleichmässige Konzentration zu sichern. — Wir möchten dem noch hinzufügen, dass den verschiedenen Ergebnissen zum Teil auch die unterschiedliche Auswertung der Versuche zugrunde gelegt werden muss.

Die unter 1. erwähnte ist eine Eigenschaft des Präparates. Die unter 2. angeführte Schwierigkeit hängt mit der Dosierung zusammen und lässt sich durch entsprechende Technik sicher ausschalten. *Schmidt*<sup>323</sup> versuchte, die gleichmässige Blutkonzentration durch häufige Verabreichung zu erzielen. Diese Methode dürfte sich kaum bewähren, da nach *Marshall* und *Cutting*<sup>261</sup> zu diesem Zweck mindestens eine 4stündliche perorale Verabreichung notwendig wäre. Eine so häufige Fütterung ist aber technisch schwierig und auch für die Tiere nicht indifferent.

Diese Tatsachen haben die Forscher veranlasst das Chemotherapeuticum mit dem Trinkwasser (*Seastone*<sup>335</sup>) oder — wie es ausführlich besprochen werden soll — mit der Nahrung der Tiere zu vermengen. *Bieter*, *Larson*, *Levine* und *Cranston*,<sup>20</sup> ferner unabhängig von ihnen *Litchfield*, *White* und *Marshall*<sup>222</sup> waren die ersten, die über Versuche dieser Art berichteten. Das Verfahren wurde von den zweiterwähnten Forschern ausgearbeitet. Die Darreichung des Chemotherapeuticums in der Nahrung wurde zu vergleichenden Zwecken bis heute auch von anderen Verfassern (*McKee*<sup>247</sup> und

seine Mitarbeiter, *Cooper*<sup>61</sup> und seine Mitarbeiter, *Bliss* und *Ott*,<sup>28</sup> *Frisk*,<sup>113</sup> ferner *Klinefelter*,<sup>193</sup> *Buttle* und *Stephenson*<sup>43</sup> durchgeführt.

*Bieter*,<sup>20</sup> *Marshall*,<sup>222</sup> *McKee*<sup>247</sup> und ihre Mitarbeiter fügten den im Handel erhältlichen Tierfutter (Purina Dog Chow) das fein pulverisierte Chemoterapeuticum in 0,5–2% Menge hinzu. Die Tiere werden in Einzelkäfigen gehalten, die verbrauchte Nahrung gemessen und hieraus auf die Arzneimenge geschlossen. Die Tiere essen im Verlaufe des Tages nicht gleichmässig, dementsprechend schwankt auch die Arzneikonzentration des Blutes, diese Schwankung aber ist nicht sehr gross. *Marshall*<sup>262</sup> und seine Mitarbeiter haben folgende Minimal- und Maximalwerte bei Sulfanilamidreichung beobachtet: Bei 1%-iger Diät 14,4–20 bei 0,5%-iger 5,7–8,5, bei 0,25%-iger 2,4–3,7, bei einem anderen Versuch 1,9–3,9. Die aus diesen Extremwerten berechneten Durchschnitte verhalten sich wie die der verzehrten Nahrungsmengen, und die Berechnung ist auf dieser Grundlage mit Hilfe eines empirisch ermittelten Faktors leicht durchzuführen. Die Faktoren, die bei Multiplizierung mit der verbrauchten Arzneimenge die Blutkonzentration ergeben, sind folgende: für Sulfanilamid 0,39, für Sulfapyridin 0,49, für Sulfathiazol 0,33, für 4,4'-Diaminodiphenylsulfon 0,77, für Sulfaguanidin 0,14. Für das Sulfon ist der Faktor grösser, wenn die Nahrung von dem Arzneimittel ganz kleine Mengen enthält. So ergibt sich bei einer 0,1%igen Kost ein Faktorwert von 1,03. Der Zusammenhang war also bei diesem Präparat am wenigsten regelmässig.

Wird das Chemoterapeuticum mit der Kost gemischt, so ist der Gehalt des Blutes an dem betreffenden Präparat in Abhängigkeit von der Art des Sulfanilamidderivates sehr verschieden. *Frisk*<sup>113</sup> fand im Blute der Tiere, die mit einer 0,56% Arzneimittel enthaltenden Kost 1 Tag oder länger gefüttert wurden, folgende Werte für die Arzneimittelkonzentration im Blute: für Sulfapyridin 7,97 mg %, für Sulfathiazol 5,41 mg %, für Sulfapyrimidin 32,2 mg %, für N<sup>1</sup>-Dimethylacryloylsulfanilamid 20,72 mg %, für Sulfathiophen 0,89 mg %. Diese Werte stellen Durchschnitte von 5tägigen Versuchen dar. *Frisk* bestimmte die Blutkonzentration immer zum selben Zeitpunkt (9 Uhr in der Früh). Die Durchschnitte der einzelnen Tage weichen selbstverständlich voneinander etwas ab. Die Extremwerte waren bei Sulfapyridin  $6,3 \pm 1,0$  und  $9,76 \pm 0,91$  mg %.

Einige Forscher infizierten die Tiere erst 24–48 Stunden nach der Einleitung der Arzneifütterung und behandelten sie weiter noch 3,<sup>262</sup> 5,<sup>113</sup> 7<sup>28</sup> oder 10<sup>20</sup> 247 Tage lang. Wurde die Infektion sofort zu Beginn der Behandlung vorgenommen, so waren die Erfolge weniger günstig. Selbstverständlich hatte die Verkürzung der Behandlungsdauer auch die Verschlimmerung der Resultate zur Folge.<sup>222</sup>

*Bieter*<sup>20</sup> und seine Mitarbeiter infizierten Mäuse subkutan mit 4.000–8.000 D. L. 50 Pneumokokken Typ 2 und fütterten sie mit einer 1 bzw. 0,5% enthaltenden Sulfapyridinkost. Auf diese Weise konnten 63,4 bzw. 44% der Tiere gerettet werden. Zur Vergleichung der Wirkung des Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol und Sulfapyridin verabreichten *Bliss* und *Ott*<sup>28</sup> den mit Staphylokokken infizierten Mäusen eine 1%-ige Diät. Bei diesen Versuchen waren beide Thiazolderivate gleichweise wirksamer als das Sulfapyridin. *McKee*<sup>247</sup> und seine Mitarbeiter fanden das Sulfapyridin und das Sulfathiazol gegen zu 9

verschiedenen Typen gehörenden Pneumokokken und je 1 Strepto- bzw. Meningokokkenstamm für gleich wirksam. *Frisk*<sup>113</sup> verglich die Wirkung von 12 verschiedenen Verbindungen bei Infektion der Maus mit *Pneumococcus* Typ 1. Als Futter diente eine Nahrung, die von den Mitteln 0,28 bzw. 0,56% enthielt. Entsprechend den zwei verschiedenen Konzentrationen konnten mit Sulfathiazol 85,7 bzw. 48,7%, mit Sulfapyridin 81,8 bzw. 55,2% der Tiere gerettet werden. Aus den Protokollen geht hervor, dass eine Nahrung, die eine niedrigere Arzneikonzentration enthielt, welches Mittel auch verwendet wurde, verhältnismässig immer mehr Tiere rettete als die konzentrierte. Entgegen der Behauptung *Frisks* kann somit festgestellt werden, dass die Verdoppelung der Arzneidosis die Wirkung nicht verdoppelt.

Da der Zusammenhang zwischen der verbrauchten Arzneimenge und dem gewährten Schutz nicht linear ist, ferner, da identische Arzneimengen selbst bei Vermischung mit dem Tierfutter verschiedene Blutspiegelwerte liefern, waren *Marshall*<sup>262</sup> und seine Mitarbeiter gezwungen, bei der Auswertung der Ergebnisse auch auf diese Umstände Rücksicht zu nehmen. Zu diesem Zweck bestimmten sie auf Grund der mit verschiedenen Arzneimengen angestellten Versuche mit Hilfe der Interpolation jene Menge des Mittels, die genau die Hälfte der Tiere gerade noch rettet. Aus dieser Menge (S. D. 50 = Median Survival Dosis) lassen sich die entsprechenden Blutkonzentrationen mit Hilfe der schon erwähnten Faktoren berechnen (S. B. C. 50 = Median Survival Blood Concentration); diese Ergebnisse wurden der Vergleichung der Mittel zugrunde gelegt. Z. B. wurde in einem ihrer Streptokokkenversuche S. B. C. 50 für Sulfanilamid 0,73, für 4,4'-Diaminodiphenylsulfon 0,27 gefunden. Das Verhältnis dieser Zahlen  $0,73:0,27 = 2,69$  bedeutet, dass das Sulfon 2,69-mal wirksamer als das Sulfanilamid sei. Die mit der selben Methodik gefundenen wichtigeren Daten sind folgende: Im Falle einer Streptococcusinfektion (200 d.l.m.) verhalten sich die Wirkung des Sulfanilamid, Sulfapyridin und Sulfon wie 1:1,08:2,69. Sulfaguanidin<sup>261</sup> ist gegen Streptokokken nur halb so wirksam wie das Sulfanilamid, gegen *Pneumococcus* Typ 1 wirken sie ungefähr gleich stark. Auf Grund ihrer<sup>223</sup> Ergebnisse verhalten sich das Sulfapyridin, Sulfanilamid, Sulfathiazol und Sulfon — gegen *Pneumococcus* Typ 1 — wie 1:0,43:1,2:5, 4—7,9.

Die Wertbestimmungsmethode von *Bieter*, *Marshall* und ihren Mitarbeitern, der die Darreichung der Präparate in der Nahrung zugrunde liegt, scheint auch uns die verlässlichste zu sein. Wir versuchen darum, die Methode auch in unserem Institut einzuführen. Zweifelsohne haftet dem Verfahren der Nachteil an, dass die individuelle Unterbringung der Tiere und die ständige Wägung der verbrauchten Futtermenge eine ansehnliche Mehrarbeit bedeutet abgesehen davon, dass das von den amerikanischen Verfassern verwendete Tierfutter heute nicht beschaffen werden kann. Darum versuchten wir zwecks Beseitigung der erwähnten Schwierigkeiten die Methode zu modifizieren. Obwohl wegen der Knappheit der Tierbestände bei den Versuchen nur eine mässige Anzahl von Tieren verwendet werden konnte und unser Ziel über die Fragen der Dosierung nicht hinausgehen kann, wollen wir unsere mit *Diczfalusy*<sup>168</sup> ausgeführten Versuche doch mitteilen, da die gewonnenen Erfahrungen für spätere Forschungen evtl. dienlich sein könnten.

Der Zweck dieser Versuche war die Ermittlung einer Modifikation, die gestattet, die individuelle Nahrungsverzehrung der einzelnen Tiere ausser acht lassend, allein aus dem Sulfanilamidgehalt der Kost auf den Blutarzneispiegel zu schliessen. Mit anderen Worten: *Gesucht wurde die Korrelation zwischen dem Sulfanilamidgehalt der Nahrung und des Blutes, ohne Rücksicht auf die von den einzelnen Tieren verbrauchte Futtermenge.*

Wie erwähnt, kam nur ein Tierfutter in Betracht, das auch heute beschaffen werden kann. Darum wurde zunächst die Nahrungsmischung ausprobiert, die bei der Mäusezüchtung verwendet wird. (Die Zusammensetzung s. auf Seite 19). Der einzige Unterschied bestand darin, dass in den Versuchen anstelle des Maisgrieses Gerstengries verwendet wurde.

Das in unserem Institut verwendete Mäusefutter enthält ziemlich viel Wasser. So erübrigt sich, den Tieren auch Trinkwasser zu geben. Da die Bestandteile der Nahrung grob gemahlen sind, wurden die Präparate, um ihre gleichmässige Verteilung zu sichern, dem Futter in gelöstem Zustand hinzugefügt. Vom Sulfanilamid und Sulfamethylthiazol wurde die abgewogene Menge in der äquivalenten Menge von karbonatfreier Natronlauge gelöst, dann dem Bedarf entsprechende 0,2–5%-ige Lösung hergestellt, 1 Teil der Lösung mit 9 Teilen der breiigen Nahrung in einer Reibschale sorgfältig vermengt. Mithin wurde die Arzneilösung mit der Nahrung aufs zehnfache verdünnt. Im Falle des 4,4'-Diaminodiphenylsulfon wurde das verhältnismässig gut lösliche Dihydrochlorid verwendet.

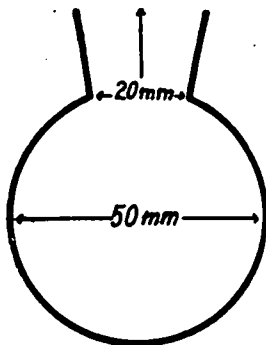


Abb. 3.

Form und Ausmass  
des Fütterungsgefässes.

Vor allem war die Frage zu beantworten, welche Futtermenge von den 18–22 g schweren Tieren verzehrt wird. Die näheren Zusammenhänge zwischen Körpergewicht und Nahrungsmittelverbrauch wurden nicht untersucht, da es technisch ohnehin unmöglich ist, in einem Versuch das individuelle Gewicht der zahlreichen Tiere innerhalb der angegebenen Grenzen zu berücksichtigen.

Die Messung der verzehrten Nahrungsmenge ist mit nicht unerheblichen Schwierigkeiten verbunden, da die Nahrung von den Tieren gewohnheitsgemäss zerwühlt und verstreut wird. Darum wurde nach längeren Versuchen der Glasfütterungsverschlagentyp verwendet, dessen Form und Ausmass aus Abb. 3 ersichtlich sind. Wird das Gefäss in lotrechter Lage auf eine Petrischale von 9 cm Durchmesser gestellt, so kann das auf den Rand des Gefässes kletternde Tier nur wenig Nahrung aus dem Gefäss verstreuen, auch die verstreute Menge fällt auf den Deckel der Petrischale und kann abgewogen werden. Wir trachteten aus dem täglich mit frischer Nahrung versorgten Fütterungsgefäss die verzehrte Nahrung mit einer ctg-Genauigkeit zu bestimmen.

Der Nahrungsverbrauch der Mäuse wurde in Tab. 8. aufgestellt.

Wie ersichtlich, ist der Nahrungsverbrauch selbst in der selben Gewichtsgruppe ziemlich schwankend. Aus der Rubrik „Extremwerte“ geht hervor, dass auch der tägliche Verbrauch desselben Tieres während der 4–7-tägigen Versuchsperiode beträchtlich wechselnd ist. Die kleinste verbrauchte Menge war 8 g, die grösste 23 g. Auf Grund der mit 14 Tieren ausgeführten 80 Bestimmungen erhielten wir einen Durchschnitt von  $14,15 \pm 0,38$  g. Die Werte weisen eine Streuung

Tabelle 8.

*Täglicher Nahrungsverbrauch der Mäuse in Grammen.*

| Bezeichnung<br>des Tieres | Versuchs-<br>dauer in<br>Tagen | Gefundene Extremwerte |         | Durchschnitt<br>sam Mittel-<br>fehler | Streuung der<br>einzelnen<br>Werte |
|---------------------------|--------------------------------|-----------------------|---------|---------------------------------------|------------------------------------|
|                           |                                | maximum               | minimum |                                       |                                    |
| 1                         | 4                              | 14,42                 | 14,08   | 14,27 $\pm$ 0,08                      | $\pm$ 0,15                         |
| 2                         | 4                              | 15,52                 | 10,11   | 11,75 $\pm$ 1,28                      | $\pm$ 2,57                         |
| 3                         | 4                              | 11,11                 | 8,00    | 9,47 $\pm$ 0,09                       | $\pm$ 0,18                         |
| 4                         | 4                              | 16,31                 | 11,41   | 13,69 $\pm$ 1,01                      | $\pm$ 2,02                         |
| 5                         | 4                              | 13,48                 | 10,85   | 11,96 $\pm$ 0,03                      | $\pm$ 0,06                         |
| 6                         | 4                              | 13,30                 | 11,79   | 12,96 $\pm$ 0,10                      | $\pm$ 0,02                         |
| 7                         | 7                              | 16,86                 | 10,20   | 13,92 $\pm$ 0,93                      | $\pm$ 2,45                         |
| 8                         | 7                              | 15,60                 | 9,65    | 11,60 $\pm$ 0,72                      | $\pm$ 1,91                         |
| 9                         | 7                              | 21,90                 | 10,30   | 14,91 $\pm$ 1,41                      | $\pm$ 3,73                         |
| 10                        | 7                              | 19,25                 | 13,00   | 16,21 $\pm$ 0,83                      | $\pm$ 2,19                         |
| 11                        | 7                              | 19,90                 | 11,60   | 16,48 $\pm$ 1,06                      | $\pm$ 2,81                         |
| 12                        | 7                              | 18,95                 | 10,30   | 15,54 $\pm$ 1,18                      | $\pm$ 3,13                         |
| 13                        | 7                              | 23,00                 | 9,80    | 17,75 $\pm$ 1,76                      | $\pm$ 4,66                         |
| 14                        | 7                              | 18,10                 | 8,98    | 13,39 $\pm$ 1,23                      | $\pm$ 3,25                         |

von  $\pm 3,41$  g auf. Dies bedeutet, dass zwei Drittel der Werte zwischen den Grenzwerten 10,74 und 17,56 liegen. Diese beträchtliche Streuung ist zum Teil durch die individuellen Unterschiede, zum Teil durch die wechselnde Fresslust desselben Tieres bedingt.

Schon diese wesentlichen Schwankungen in der Nahrungsaufnahme machen es notwendig, anstatt der individuellen Werte den in den einzelnen Gruppen beobachteten Durchschnitt zu berücksichtigen. Dies um so mehr, als die Wertbestimmung der Sulfanilamidpräparate in einer befriedigenden Weise nur unter der Heranziehung einer grösseren Anzahl von Tieren erfolgen kann. Es erübrigt sich dann, den Blutarzneispiegel für jedes Tier auf Grund seines individuellen Nahrungsverbrauches zu errechnen. Ausgehend von diesen Erwägungen wird bei uns — abweichend von der Methodik der amerikanischen Verfasser — der Nahrungsverbrauch bzw. die hiermit verbundene Arzneimiteleinfuhr nicht beachtet, sondern nur der direkte Zusammenhang zwischen dem Arzneigehalt der Nahrung und dem Blutspiegel gesucht. Hierdurch ist aber die individuelle Unterbringung der Tiere und die Messung des Nahrungsverbrauches überflüssig geworden.

In bezug auf den Zusammenhang zwischen Arzneigehalt der Nahrung und Blutarzneispiegel geben Tabelle 9. und 10. Aufschluss.

Zur Vereinfachung und um einen Durchschnitt zu gewinnen wurde die Sulfanilamidkonzentration an Gruppen von je 5 Tieren mit 18—22 g Gewicht studiert. Die Tiergruppen wurden mit einer das entsprechende Sulfanilamid enthaltenden Kost ernährt und die Konzentration der Mittel im Blute der Tiere nach 24—48 Stunden serienweise bestimmt, und zwar in der Weise, dass das Blut der fünf Tiere derselben Gruppe zu einem gegebenen Zeitpunkt vermengt wurde. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens liegt in dem Umstand, dass aus der Schwanzvene der einzelnen Tiere nur je 0,02 ccm Blut zu entnehmen ist, was für die Tiere keinerlei Schädigung bedeutet; nach Vermengung der fünf Blutproben

erhält man 0,1 ccm, das zur genauen Bestimmung der Sulfanilamide selbst in Falle einer sehr niedrigen Konzentration ausreicht. In dieser Weise konnte die Untersuchung im Laufe der zweitägigen Versuchsperiode bei denselben Tieren wiederholt und doch ohne Schädigung der Tiere durchgeführt werden. Die Blutentnahme erfolgte frühestens 24 Stunden nach Einleitung der Fütterung früh um 9, nachmittags um 3 und abends um 9 Uhr. Die im Laufe des Tages vorgenommenen Untersuchungen lieferten schwankende Ergebnisse. In Übereinstimmung mit anderen Verfassern wurden im allgemeinen niedrigere Früh- und höhere Abendwerte gefunden. Der Durchschnitt wurde aus dem Frühminimum und dem Abendmaximum berechnet.

Zur Bestimmung der Sulfanilamidkonzentration verwendeten wir die Methode von *Druey* und *Oesterheld*<sup>32</sup> in der Modifikation von *Diczfalusy* und *Sonkoly*.<sup>72</sup> Das Originalverfahren erfordert 1 ccm Blut und lässt das Ergebnis von einem Kolorimeter ablesen. Die Modifikation arbeitet mit 0,1 ccm. Um eine genaue Ablesung zu gewähren, wird ein Stufenphotometer verwendet. Die Mikromethode von *Diczfalusy* und *Sonkoly* wird wie folgt ausgeführt:

Die erforderlichen Lösungen sind mit denen des Originalverfahrens identisch: 10%-ige Trichloressigsäure, 0,1%-ige frisch zubereitete Natriumnitritlösung 0,5%-ige Sulfaminsäure und 0,1%-iges Dinatriumsalz der 1-Sulfamethylaminonaphthalin-8-sulfosäure.

Um die Blutentnahme zu erleichtern, werden die Tiere zunächst 30–50 Minuten in einem Brutschrank gehalten. Das Tier wird senkrecht mit dem Schwanz nach unten gehalten, das Schwanzende abgekniffen und 0,02 ccm Blut mit einer Sahlischen Hämoglobinpipette in 2,4 ccm dest. Wasser eingeführt. Nach der Entnahme von je 0,02 ccm Blut von jedem Tier der Fünfergruppe beträgt die im Reagenzglas befindliche Flüssigkeitsmenge 2,5 ccm. Nach einigen Minuten wird das Reagenzglas in heisses Wasser getaucht, sein Inhalt nach 2 Min. mit 1 ccm 10%-iger Trichloressigsäure versetzt und sofort filtriert. Aus dem Filtrat werden 2,5 ccm abpipettiert und in einem anderen Reagenzglas in schmelzendes Eis gestellt, nach Abkühlung mit 0,5 ccm Nitritlösung und 3 Min. später mit 0,5 ccm Sulfaminsäure versetzt, schliesslich wiederholt umgeschüttelt und nach 1 Min. mit 1 ccm Reagens versetzt. Nach 10 Min. stehen wird die Extinktion in einer 10 mm hohen Küvette mit dem Filter S 50 mit Hilfe des Stufenphotometers bestimmt. Die aufgenommene Kurve zeigt einen linearen Verlauf und eignet sich sowohl für das Sulfanilamid als auch für das Sulfamethylthiazol unter Beachtung der äquivalenten Gewichte. Das 4,4'-Diaminodiphenylsulfon liefert eine mehr bläuliche Farbe; weshalb zur Bestimmung dieses Mittels eine besondere Kurve aufgenommen werden muss. Selbst bei Konzentrationen von 0,2–0,3 mg % erhält man noch gut ablesbare Werte.

Das Verfahren erwies sich als sehr genau und verlässlich. Das ursprüngliche Makroverfahren liefert etwas niedrigere, die Mikromethode etwas höhere Werte als die theoretisch errechneten. Zur Veranschaulichung der Zuverlässigkeit der Methode seien folgende Resultate angeführt: Menschlichem Zitratblut wurde 4 mg % Sulfanilamid hinzugefügt; 6 Bestimmungen ergaben einen Durchschnitt von 4,04 mg %. Anstelle von 4 mg % Sulfamethylthiazol erhielten wir 4,13 mg %, anstatt 4 mg % Sulfon 4,11 mg %, anstatt 10 mg % aber 9,9 mg %.

Tabelle 9.

*Schwankung des Blutsulfamethylthiazolspiegels bei einer verschiedenen Menge des Präparates enthaltender Kost.*  
(48 stündige Beobachtungszeit.)

| Konzentration des Präparates in der Nahrung | Konzentration des Präparates im Blut (mg %) |                      |                      |                      |                      |
|---|---|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
|   | 9 <sup>h</sup> v. M.                        | 8 <sup>h</sup> n. M. | 9 <sup>h</sup> v. M. | 3 <sup>h</sup> n. M. | 9 <sup>h</sup> n. M. |
| 5 ‰   | 15,3  | 23,0                 | 16,8                 | 16,2                 | 19,7                 |
| 2 ‰   | 10,3  | 14,6                 | 12,0                 | 9,4                  | 13,4                 |
| 1 ‰   | 6,4   | 9,1                  | 6,2                  | 6,4                  | 8,4                  |
| 0,5 ‰                                       | 5,4   | 8,8                  | 3,8                  | 4,8                  | 4,4                  |



Aus einem der in Tab. 9. angeführten Versuche ersieht man, dass der Blutarzneispiegel der mit Sulfamethylthiazol gefütterten Tiere ausgeprägte Tagesschwankungen zeigt, wie es auch von anderen Verfassern beobachtet wurde.

Die Ergebnisse der an Gruppen von je 5 Tieren ausgeführten Bestimmungen wurden in Tabelle 10. zusammengestellt.

Tabelle 10.

*Beziehungen zwischen dem Arzneigehalt der Nahrung und des Blutes.*

| Chemotherapeuticum und seine Konzentration in der Nahrung |         | Konzentration in Blut bei den einzelnen Versuchen | Durchschnitt der Versuche |
|---|---------|---|---------------------------|
| Sulfanilamid  | 5 ‰     | 18,0 mg ‰   | 17,95 mg ‰                |
| "   | " "     | 17,9 " "  |                           |
| "   | 2 "     | 5,8 " "   | 6,25 mg ‰                 |
| "   | " "     | 6,7 " "   |                           |
| "   | 1 "     | 4,5 " "   | 4,15 mg ‰                 |
| "   | " "     | 3,8 " "   |                           |
| "   | 0,5 "   | 2,3 " "   | 2,05 mg ‰                 |
| "   | " "     | 1,8 " "   |                           |
| "   | 0,2 "   | 0,6 " "   | 0,60 mg ‰                 |
| Sulfamethylthiazol  | 5 "     | 17,8 " "  | 18,80 mg ‰                |
| "   | " "     | 18,7 " "  |                           |
| "   | " "     | 19,9 " "  |                           |
| "   | 2 "     | 11,8 " "  | 11,80 mg ‰                |
| "   | " "     | 12,5 " "  |                           |
| "   | " "     | 11,1 " "  |                           |
| "   | 1 "     | 9,2 " "   | 7,83 mg ‰                 |
| "   | " "     | 7,5 " "   |                           |
| "   | " "     | 6,8 " "   |                           |
| "   | 0,5 "   | 7,3 " "   | 5,53 mg ‰                 |
| "   | " "     | 5,6 " "   |                           |
| "   | " "     | 3,7 " "   |                           |
| "   | 0,2 "   | 1,5 " "   | 1,50 mg ‰                 |
| 4,4' — Diaminodi-phenylsulfon                             | 0,5 "   | 6,6 " "   | 7,35 mg ‰                 |
| "   | " "     | 8,1 " "   |                           |
| "   | 0,125 " | 3,3 " "   | 2,96 mg ‰                 |
| "   | " "     | 2,6 " "   |                           |
| "   | 0,025 " | 2,3 " "   | 2,30 mg ‰                 |

Hieraus folgt, dass die zu verschiedenen Zeitpunkten an verschiedenen Tiergruppen gewonnenen Werte von Blutarzneispiegel sich wie die Arzneikonzentration der Nahrung verhalten. Die

beobachteten Blutwerte sind erheblich höher als die von anderen Verfassern bei der Anwendung einer Kost der nämlichen Arzneikonzentration gefundenen. Wir glauben diese Tatsache durch den Umstand erklären zu können, dass die Mäuse von der von uns gebotenen Nahrung wegen ihres grösseren Wassergehaltes um ein vielfaches mehr verzehren als von den trockenen Nahrungen anderer Forscher. Die aus dem Durchschnitt der einzelnen Versuche erhaltenen Kurven zeigen den Zusammenhang zwischen Arzneigehalt der Nahrung und des Blutes.

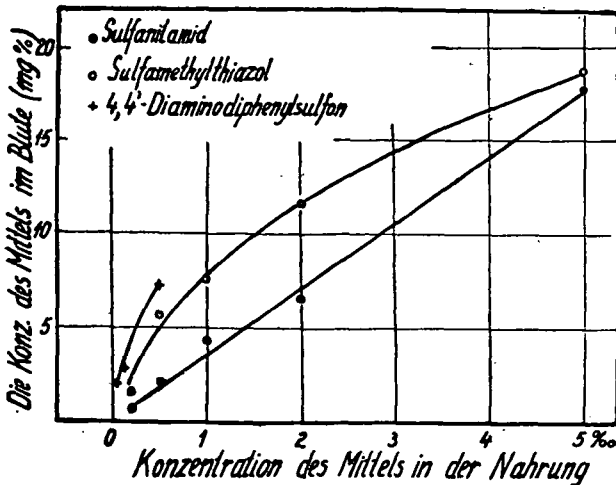


Abb 4.

Zusammenhang zwischen Arzneigehalt der Nahrung und des Blutes.

Aus der Kurve ersieht man das lineare Verhältnis zwischen der Sulfanilamidkonzentration von Nahrung und Blut. Die Sulfamethylthiazolkurve entspricht einer Parabel, d. h. das Präparat wird im Falle einer niedrigeren Konzentration besser resorbiert als bei Verwendung einer mehr Arznei enthaltenden Kost. Die Ursache dieser Erscheinung konnten wir bisher nicht feststellen. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Nahrung, die das Arzneimitteln in einer grösseren Konzentration enthält, von den Tieren weniger gierig genommen wird. In bezug auf die Sulfonresorption konnte nur ein kurzer Abschnitt der Kurve gezeichnet werden, da die Unruhe der Tiere schon bei der 0,05% enthaltenden Diät auf die Toxizität des Mittels hinweist, weshalb die Anwendung einer noch höheren Konzentration nicht in Frage kam. Seltsamerweise findet man im Blut der Tiere, deren Nahrung verhältnismässig sehr geringe Sulfonmengen enthält, ziemlich hohe Werte, wofür auch der Kurvenverlauf spricht, so fanden wir bei einer 0,025 ‰igen Nahrungskonzentration 2,3 mg % im Blute (s. Tab. 10.). Wir glaubten, dass vielleicht die Mikromethode der sehr niedrigen Konzentrationen nicht entspreche und gaben darum drei Gruppen von je 5 Tieren diese Diät; dann töteten wir die Tiere mit Chloroform und bestimmten die Arzneikonzentration in je 1 ccm dem Herzen entnommenen Blut nach der *Druy-Oesterhelds*chen Originalmethode. Die gefundenen Konzentrationen waren 2,1, 1,8 und 2,3 mg % nach Verabreichung einer 0,025 ‰ Sulfon enthaltenden

Kost. Es steht also fest, dass sehr geringe Mengen des Sulfons verhältnismässig viel besser resorbiert werden als grössere Mengen. Diese Beobachtung stimmt mit denen von *Marshall* und seinen Mitarbeitern gut überein.

Die Ergebnisse zusammenfassend, lässt sich folgendes feststellen: 1. *Die Resorption des mit der Nahrung gemischten Sulfanilamid hängt hochgradig von der Zusammensetzung der Nahrung ab*, wahrscheinlich deshalb, weil der Tagesbedarf entsprechend den einzelnen Nahrungsmitteln veränderlich ist. 2. *Die Sulfanilamidkonzentration des Blutes hängt mit dem Sulfanilamidgehalt der Nahrung zusammen, so dass aus dem Wert des letzteren die erste errechnet werden kann.* 3. *Der Zusammenhang ist, abhängig von dem Präparat, von verschiedenem Typ und ist nicht immer linear.* 4. *Unser Verfahren bedeutet gegenüber dem der amerikanischen Verfasser technische Vorteile, da die individuelle Unterbringung der Tiere und die Messung der verzehrten Nahrung sich erübrigen.*

### III. Kapitel.



## In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate.

### 1. Die die In-vitro-Wirkung beeinflussenden Versuchsfaktoren.

Es ist kein Zufall, dass die unmittelbar auf die Krankheitserreger ausgeübte Wirkung der Sulfanilamidderivate gerade Londoner Bakteriologen nachweisen konnten. Die antibiotische Wirkung der Sulfanilamidderivate kann nämlich mit der groben Wirkung der gewöhnlichen Desinfizienzien, die sich schon bei den einfachsten Versuchsbedingungen merkbar macht, nicht verglichen werden. Zum Nachweis dieser Wirkung bedarf es solch feiner Methoden, die damals nur den Schülern von *A. E. Wright* zur Verfügung standen.

Die Entdeckung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung wollen wir nicht noch einmal erörtern, nur so viel sei erwähnt, dass die 1937 veröffentlichten Ergebnisse von *Colebrook*, *Buttle* und *O'Meara*<sup>57</sup> noch im selben Jahr oder Anfang des nächsten Jahres von zahlreichen Forschern (*Nitti*, *Bovet* und *Depierre*,<sup>287</sup> *Long* und *Bliss*,<sup>232</sup> *Hoare*,<sup>150</sup> *Finklestone-Sayliss*, *Paine* und *Patrick*,<sup>95</sup> *Gay* und *Clark*,<sup>122</sup> *Buttle*<sup>42</sup> und seinen Mitarbeitern) bestätigt wurden. Sie haben ausnahmslos festgestellt, dass das dem Blut oder der Fleischbrühe im Verhältnis 1:1000—1:10.000 hinzugefügte Sulfanilamid das Gedeihen von einigen abgeimpften Kokken verhindert oder die Kokken gerade tötet. *Helmholtz*<sup>144</sup> berichtete noch im Jahre 1937 über die starke bakteriostatische Wirkung des Urins von Personen, die mit Sulfanilamid behandelt wurden.

Es scheint weniger interessant, die Ergebnisse dieser übereinstimmenden Versuche zu besprechen, als die diesen widersprechenden Beobachtungen. *Bürgers*<sup>45</sup> schreibt über die Versuche *Colebrooks* und seiner Mitarbeiter (1937) wie folgt: „Neuere Versuche von *Domagk* und mir können allerdings diese Tatsache nicht bestätigen.“ Die Ein-

zelheiten seiner eigenen Versuche werden nicht erwähnt, so dass ein Rückschluss auf ihre Art nur auf Grund der Arbeit *Domagks* möglich ist. *Domagk*<sup>76</sup> lehnt die direkte („desinfizierende“) Wirkung des Sulfanilamid auf Grund des nachstehenden Versuchs ab: 50 ccm 48 Stunden alte Streptokokken-Bouillonkultur wurde mit 0,5 g Sulfanilamid versetzt und 48 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Bei der Weiterimpfung machte er die Beobachtung, dass selbst der kleinste Tropfen dieser Kultur zahlreiche lebende Kokken enthielt. *Bürgers*<sup>46</sup> beharrte auch im Jahre 1939 noch auf dem Standpunkt, dass dem Sulfanilamid und dem Uliron keine wesentliche bakteriumschädigende Wirkung zukommt. Auf Grund der gegenwärtigen Kenntnisse ist nicht der Umstand auffallend, dass in den Versuchen *Rosenthals*<sup>313</sup> der Versuch, die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid gegen Colibazillen und Streptokokken nachzuweisen, fehlgeschlagen hat, sondern die Tatsache, dass diese Wirkung mit seiner Methode gegen 6 verschiedene Pneumokokkenstämme erwiesen werden konnte. Der Erfolg des Versuchs dürfte im letzten Falle dadurch bedingt sein, dass er zur Impfung der sulfanilamidhaltigen Nährböden 18 Stunden alte Kulturen verwendete; bekanntlich erfahren in solch alten Kulturen die Pneumokokken oft eine Spontanschädigung infolge der Autolyse. *Britton*<sup>35</sup> impfte sulfanilamidhaltige Fleischbrühe mit 0,4 ccm Bouillonkultur verschiedener Bakterien ein. Obwohl er eine geringfügige Hemmung beobachtete, hielt er dieser für derart unbedeutend, dass er schliesslich nur äusserte: die Sulfanilamide haben gar keine bakteriostatische Wirkung. *Fischer*<sup>99</sup> beobachtete, dass die Streptokokken in der 1% Sulfanilamid enthaltenden Fleischbrühe nicht gedeihen; niedrigere Konzentrationen aber waren unwirksam. Nähere Angaben über die Versuchsmethode fehlen aus der Arbeit, weshalb nicht festgestellt werden kann, warum seine Versuche zum Teil erfolglos waren. Dem Umstand, dass das Sulfanilamid und das Sulfapyridin in den Versuchen von *Burton*<sup>38</sup> und seinen Mitarbeitern unwirksam befunden wurden, liegt wahrscheinlich das zu grosse Inoculum zugrunde.

Die Tatsache, dass die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide von den einzelnen Verfassern derart verschiedentlich beurteilt wird, kann durch die Verschiedenheit der Versuchsbedingungen erklärt werden. *Die Veranschaulichung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung hängt nämlich hochgradig von der Versuchstechnik ab.* Im folgenden wollen wir uns mit diesem theoretisch und praktisch gleichweise wichtigen Problem befassen. Zunächst sei auf die Bedeutung der Inoculumgrösse hingewiesen.

Bei der Prüfung der antibiotischen Eigenschaften der in der Praxis bewährten Antiseptica trachtete man früher, ihre desinfizierende Wirksamkeit festzustellen. Erst seit Kurzem wird auch der bakteriostatischen Wirkung Beachtung geschenkt. Über den bakteriostatischen Wert der einzelnen Desinfizienzien äussern sich die einzelnen Verfasser sehr verschiedentlich, so weichen z. B. die Ansichten über die bakteriostatische Wirksamkeit des Phenyl-mercurinitrates<sup>21, 371</sup> voneinander stark ab. *Garrod*<sup>119</sup> legt den Meinungsunterschieden die Verschiedenheit der in den Versuchen verwendeten Inoculumgrösse zugrunde. Er fand nämlich den bakteriostatischen Titer des Phenyl-mercurinitrates nach 0,1 ccm Inoculum bei  $1,28 \times 10^{-6}$

nach  $10^{-7}$  ccm bei  $5 \times 10^{-7}$ . Ähnliche, obwohl geringere Unterschiede beobachtete er auch bei der Ermittlung der bakteriostatischen Wirkung des Phenols. Die ausserordentliche Bedeutung der Inoculumgrösse kommt besonders bei der Prüfung der Sulfanilamidderivate zur Geltung. *Im Falle eines grossen Inoculums zeigen diese Mittel anscheinend überhaupt keine, nach der Abimpfung von wenigen Bakterien aber eine bedeutende bakteriostatische Wirkung.* Dies geht aus einem grundlegenden Versuch Colebrooks<sup>57</sup> und seiner Mitarbeiter besonders klar hervor. In diesem Versuch wurde die Fleischbrühe mit Sulfanilamid im Verhältnis 1:10.000 versetzt und mit 35—50 Streptokokken geimpft. In diesem Nährboden konnten die Kokken nicht gedeihen, während ihr Wachstum in der mit 300 Millionen Kokken geimpften Bouillon selbst durch 1% Sulfanilamidzusatz nicht verhindert werden konnte. Die Beziehungen zwischen Inoculumgrösse und Sulfanilamidwirkung wurden seitdem von zahlreichen Forschern bestätigt, die die Frage auch in ihren Details studierten (Nitti, Bovet und Depierre,<sup>287</sup> Long und Bliss,<sup>232</sup> Finklestone-Sayliss<sup>98</sup> und Genossen, Lockwood,<sup>227</sup> MacIntosh und Whitby,<sup>246</sup> Green,<sup>127</sup> Hirsch,<sup>148</sup> Rose und Fox.<sup>311</sup>

Für die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate ist die Bedeutung der Zusammensetzung des verwendeten Nährbodens kaum geringer als die der Inoculumgrösse. Die bakteriostatische Wirkung kann in einem sehr verschiedenen Ausmasse zur Geltung kommen, abhängig davon, ob das Präparat defibriniertem Blut oder leukozytenfreiem Blut hinzugefügt wird. Auch die das Blut liefernde Tierart ist wichtig; <sup>57, 118, 150, 328</sup> im Blut des Menschen oder des Affen ist das Sulfanilamid ziemlich wirksam, im Kaninchen-, Meerschweinchen- oder Mäuseblut erheblich weniger. Nach Winkler und Julius<sup>389</sup> enthalten die Blutkörperchen der Pferde einem Stoff, der die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid fördert. Die die Wirksamkeit des Sulfanilamid herabsetzende Wirkung ganz keiner, dem menschlichen Blut hinzugegebener Peptonmengen (0,6 mg. pro ccm) wurde zum ersten Male von Lockwood<sup>227, 228</sup> nachgewiesen; die Antisulfanilamid-Wirkung der Peptone wurde auch durch andere Forscher <sup>102, 148, 246, 252</sup> bestätigt. Die bakteriostatische Wirkung wird auch von der Art des Peptons beeinflusst: Long und Bliss<sup>231</sup> beobachteten eine verschiedene Wirkung des Sulfanilamid auf einen zur Gruppe G gehörenden Streptococcus abhängig davon, ob die Fleischbrühe mit Proteose- oder Neopepton hergestellt wurde. Merkwürdigerweise fanden Weld und Mitchell<sup>374</sup> — im Gegensatz zu den vorigen — die Peptonhemmung im Kaninchenserum für unbedeutend. Die zur Herstellung der Fleischbrühe verwendeten Organe und der Grad ihrer Autolyse können gleichfalls eine Rolle spielen.<sup>252, 349</sup>

Dem Alter der Bakterienkultur kommt schon eine geringere Bedeutung zu, als der Inoculumgrösse. Finklestone-Sayliss<sup>98</sup> und seine Mitarbeiter impften 1:10.000 Sulfanilamid enthaltendes Menschenblut ungefähr mit der gleichen Zahl von Kokken, die verschiedenaltigen (8, 12, 16, 24 und 26 Stunden) Kulturen entnommen wurden. Am Anfang des Versuches entstanden aus je 1 ccm Röhreninhalt 100—200 Kolonien. Im Falle des 8 Stunden alten Inoculums entwickelten sich nach 4 Stunden aus derselben Menge 2500 Kolonien, von diesem Zeitpunkt an hat sich die Zahl der Kokken rasch verringert. Bei Ver-

wendung der aus älteren Kulturen gewonnenen Inocula war der anfängliche Anstieg, parallel zum Alter der Kultur, immer weniger steil. Nach Anwendung der 26 Stunden alten Kultur wurde das Phänomen nicht mehr beobachtet. *Der Umstand, dass die Sulfanilamid-derivate das Wachstum der in den Nährboden geimpften Bakterien erst nach Ablauf einer gewissen Zeit (2—5 Stunden) wesentlich zu hemmen beginnen, wurde auch von zahlreichen anderen Verfassern*<sup>53, 227, 232, 246, 311, 328</sup> beobachtet. Will man den Grad des Gedeihens aus der Trübung mit unbewaffneten Augen beurteilen, so kann dieses anfängliche Gedeihen nur im Falle eines grossen Inoculums bemerkt werden.<sup>311</sup>

Der Einfluss von scheinbar belanglosen Nebenumständen auf die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamid-derivate erhellt aus einer Beobachtung von *Mellon* und *Shinn*;<sup>274</sup> wenn sie zur Verdünnung des Inoculums verschiedene Medien verwendeten (Kochsalzwasser oder Fleischbrühe), war auch die bakteriostatische Wirkung verschieden. Es scheint darum zweckmässig, im Falle empfindlicher Erreger (z. B. Strepto- und Pneumokokken) die Verdünnungen mit dem bei den Versuchen auch sonst verwendeten Nährboden herzustellen.

Vom Gesichtspunkte der bakteriostatischen und noch mehr der „bakteriziden Wirkung“ kommt es auch darauf an, bei welcher Temperatur die Versuche angestellt werden.<sup>34, 38, 127, 374, 382</sup> Bei 39—41° ist die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid erheblich stärker als bei 37°. *Frisk*<sup>113</sup> erklärt diese Erscheinung mit der Tatsache, dass die Bakterien bei höheren Temperaturen auch sonst schlechter gedeihen als bei der optimalen. Es hat aber den Anschein, dass geringe Temperaturunterschiede belanglos sind; so ist die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid gegen Streptokokken bei 37° und 38° die gleiche.<sup>164</sup>

Wie ersichtlich, wird die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamid-derivate von den Versuchsbedingungen hochgradig beeinflusst. Man soll deshalb darauf gefasst sein, dass in den zu verschiedenen Zeitpunkten hergestellten Fleischbrühen ein und dasselbe Präparat verschiedene bakteriostatische Werte aufweisen wird. Verwendet man Peptonwasser, so lassen sich die Versuche unter besser standardisierbaren Bedingungen ausführen. In diesem Fall ist aber die hemmende Wirkung des Peptons zu berücksichtigen, die die bakteriostatischen Eigenschaften dieser Präparate nur zum Teil zur Geltung kommen lässt. Aus diesem Grunde ist man vielmehr bestrebt, diese Versuche in pepton- und fleischextraktfreien Nährböden durchzuführen. Im Falle von wenig anspruchsvollen Mikroorganismen, z. B. bei den Colibazillen, wird man dieser Bedingung durch die Verwendung synthetischer Nährböden leicht gerecht. Der Stickstoffbedarf anspruchsvollerer Bakterien kann derart verwickelt sein, dass er nur mit einer grossen Zahl verschiedener Aminosäuren oder mit Eiweisshydrolysaten gedeckt werden kann. Von den Hydrolysaten kommt das Caseinhydrolysat an erster Stelle in Betracht, da das Casein leichter gereinigt werden kann, als z. B. das Serumalbumin oder die Gelatine. Die mit Caseinhydrolysaten hergestellten sog. halbsynthetischen Nährböden sind einfach und billig herzustellen, weshalb sie sich in der Praxis besser bewähren, als die aus reinen

Aminosäuren hergestellten. In letzter Zeit werden immer öfter Versuche veröffentlicht, die mit synthetischen oder halbsynthetischen Nährböden durchgeführt wurden. In diesem Zusammenhang möchten wir erwähnen, dass *Domagk*<sup>75</sup> die hohe Bedeutung der synthetischen Nährböden bei der chemotherapeutischen Forschung schon 1936, unmittelbar nach der Entdeckung des Prontosil, betonte. Bisher wurden Untersuchungen mit dieser Methodik mit *Coli*-,<sup>36 112 148 166 252 289 391</sup> Ruhr-,<sup>159</sup> Typhus- und Paratyphusbazillen,<sup>159 282</sup> *Strepto*-,<sup>165</sup> und Pneumokokken,<sup>112</sup> Lactobazillen,<sup>281</sup> *Cl. acetobutylicum*<sup>319</sup> usw. durchgeführt.

## 2. Messung der In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate.

Die Einfachheit der Reagenzglasversuche hat dazu beigetragen, dass nach der Entdeckung *Colebrooks* und seiner Mitarbeiter die direkte (in vitro) Wirkung der Sulfanilamidderivate von zahlreichen Forschern geprüft wurde. Nichts ist ein besserer Beweis für die Berechtigung der Reagenzglasversuche, als die Tatsache, dass schliesslich derartige Versuche zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der Sulfanilamidderivate führten. Vom Gesichtspunkte der direkten Wirksamkeit aus sind nicht nur die qualitativen, sondern auch die quantitativen Verhältnisse wichtig, so ist es begreiflich, dass zur Beseitigung der oben besprochenen störenden Umstände bisher zahlreiche Versuche gemacht wurden. Die genaue Kenntnis der quantitativen Wirksamkeit ist schon deshalb wichtig, weil eine Antwort auf die Frage, ob den therapeutischen Eigenschaften der einzelnen Sulfanilamide allein die direkte Wirkung zugrunde liegt, nur auf diese Weise erteilt werden kann. Im folgenden wollen wir die zur Verfügung stehenden Verfahren im allgemeinen besprechen, mit besonderer Rücksicht auf die Frage, wie weit diese Methoden zur quantitativen Bestimmung und zahlenmässigen Angaben der direkten Wirkung geeignet sind. In Verbindung mit diesem Problem soll auch die von uns verwendete Technik besprochen werden.

Früher wurde die In-vitro-Wirkung der Sulfanilamidderivate vorwiegend in defibriniertem Menschenblut gemessen. Das Blut wird mit einer gewissen Menge des Präparates und dann mit einer bekannten Zahl von Bakterien versetzt. Das Gedeihen der Bakterien — bzw. ihre Hemmung — wird mit Hilfe der zeitweise vorgenommenen Bakteriumszählung oder der *Wright*schen<sup>395</sup> „slide cell“-Technik verfolgt. Von den zahlreichen Versuchen dieser Art soll auf die von *Colebrook*<sup>57, 58</sup> und seinen Genossen, *Long* und *Bliss*,<sup>232</sup> *MacIntosh* und *Whitby*,<sup>246</sup> *Hoare*,<sup>150</sup> *Fleming*,<sup>101</sup> *Finklestone-Sayliss*,<sup>98</sup> ferner *Rammelkamp*<sup>306, 307</sup> und seinen Mitarbeitern, *Grumbach*<sup>136</sup> und zahlreichen anderen, die hier nicht angeführt werden können, verwiesen werden.

Obwohl die im Blut angestellten Versuche den im Organismus bestehenden Verhältnissen am nächsten stehen und aus diesem Grunde für gewisse Studien unentbehrlich sein dürften, ist diese Methode zur quantitativen Bestimmung der direkten Wirkung einzelner Präparate wenig geeignet; da das Verfahren zahlreiche Fehlerquellen hat: 1. Die Versuche können unter identischen Bedingungen kaum wiederholt werden; verwendet man das Blut derselben Tierart,

so weist ein Mittel in den Blutproben die von verschiedenen Individuen zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnen werden, nicht immer dieselbe Wirkung auf. 2. Die bakteriostatische Wirkung ist im Blut wegen der im Blut befindlichen Hemmstoffe schwächer als in Wirklichkeit. 3. In den Leukozyten<sup>57</sup>, <sup>150</sup> und im Serum<sup>308</sup> befinden sich bakterizide Stoffe, die die Wertbestimmung in der anderen Richtung stören. 4. Die Verteilung der einzelnen Präparate zwischen Serum und Formelementen ist nicht identisch; z. B. das Sulfanilamid befindet sich in den roten Blutkörperchen in einer wesentlich höheren Konzentration als im Plasma; mit dem Sulfamethylthiazol verhält es sich umgekehrt.<sup>113</sup> 5. Geringere Unterschiede der Wirksamkeit kommen bei dieser Methode nicht zum Ausdruck. 6. Die quantitativen Verhältnisse lassen sich schwer zahlenmässig ausdrücken.

Der Urin kommt als Nährboden zur theoretischen Erforschung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung wegen der in ihm enthaltenen Hemmstoffe gleichfalls nicht in Frage. Dagegen gelangten mit dieser Methode *Helmholtz*,<sup>144</sup> *Cokkinis*,<sup>56</sup> *Rammelkamp* und *Juwel*,<sup>306</sup> *Vetro*<sup>365</sup> und andere zu praktisch wichtigen Ergebnissen.

Die Zahl der in Peptonwasser und Fleischbrühe ausgeführten Versuche<sup>35, 53, 57, 102, 212, 313, 328, 349, 380, 390</sup> ist schon heute fast unübersichtlich hoch. Selbsttendend können auch bei diesen Nährböden die in ihnen befindlichen Hemmstoffe Verhältnisse vortäuschen, die den wahren nicht entsprechen. Viele verwenden zur Bestimmung der bakteriostatischen Wirkung der Sulfanilamidderivate Agar, Serumagar oder Blutagar.<sup>38, 80, 158, 186, 328</sup> Auch in diesen Fällen werden die Ergebnisse von den Hemmstoffen, die sich im Ausgangsmaterial der Agarnährböden befinden, beeinflusst. Nach unserer Ansicht gibt es bei der Anwendung fester Nährböden ausser den erwähnten auch andere Umstände, die die Ergebnisse in einem falschen Licht erscheinen lassen. Vor allem soll man bedenken, dass die Bakterien auf einem festen Nährboden sich nie in einer derart direkten, unbeschränkten und engen Berührung mit den Nährstoffen und den Chemotherapeutica befinden, wie im Falle eines flüssigen Nährbodens. Wir glauben, dass infolge dieser Verhältnisse die Diffusion der Präparate nach dem Zellinneren von zahlreichen Umständen, vom kolloidartigen Agar-Agar, Serum oder Blut, beeinflusst wird. Es wurden Beobachtungen gemacht, die für diese Annahme sprechen. *Kimmig* und *Weselman*<sup>187</sup> haben in Kataphoreseversuchen festgestellt, dass die Sulfanilamidderivate von den Serumeiweisskörpern, besonders dem Albumin, adsorbiert werden. Nach *Davis*<sup>68</sup> werden diese Mittel in irgend einer Form an die Plasmaproteine gebunden. Dennoch sind die festen Nährböden trotz dieser Nachteile für die Versuche mit Gono- und Meningokokken unentbehrlich, weil sie auf festen Nährböden erheblich besser gezüchtet werden können. Eine bessere Lösung kommt auch deshalb nicht in Frage, weil ein synthetischer Nährboden, der die Züchtung dieser ausserordentlich anspruchsvollen Erreger gestattet, vorläufig nicht zur Verfügung steht.

Zur Veranschaulichung der Technik der Agarplattenversuche dient folgender Meningokokkenversuch.<sup>158</sup>

Ein 45—47° warmer, 20% Aszitesflüssigkeit enthaltender Agarnährboden wird mit verschiedenen Mengen der Natriumsalzlösungen von Sulfamethylthiazol, Sulfapyridin und Sulfanilamid versetzt und zu Platten gegossen. Jetzt



wurde die 8 stündige Aszites-Schrägagarkultur von *Meningococcus* Typ Gordon I. mit 5 ccm Fleischbrühe abgeschwemmt, aus der Suspension verschiedene Verdünnungen hergestellt und in einer Menge von je 1 Öse voll zur Impfung der verschieden konzentrierten Agarplattensektoren verwendet. Als Inoculumeinheit gilt 1 Öse voll der 1:10.000 verdünnten Suspension; diese Menge entspricht ungefähr 3500 Kokken. Die nach 24 Stunden beobachteten Ergebnisse sind aus Tabelle 11. ersichtlich.

Tabelle 11.

*Bakteriostatische Wirkung verschiedener Präparate gegen Meningokokken auf einem 20 %-igen Aszitesagar.*

| Konz. des Mittels<br>mg % | S. methylthiazol             |                 |                 |                 | S. pyridin |                 |                 |                 | Sulfanilamid |                 |                 |                 |
|---------------------------|------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                           | Zahl der abgeimpften Inocula |                 |                 |                 |            |                 |                 |                 |              |                 |                 |                 |
|                           | 10                           | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10         | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> | 10           | 10 <sup>2</sup> | 10 <sup>3</sup> | 10 <sup>4</sup> |
| 0,0                       | 4                            | 4               | 4               | 4               | 4          | 4               | 4               | 4               | 4            | 4               | 4               | 4               |
| 0,1                       | 4                            | 4               | 4               | 4               | 4          | 4               | 4               | 4               | 4            | 4               | 4               | 4               |
| 0,2                       | 0                            | 1               | 3               | 4               | 4          | 4               | 4               | 4               | 4            | 4               | 4               | 4               |
| 0,5                       | 0                            | 0               | 0               | 1               | 4          | 4               | 4               | 4               | 4            | 4               | 4               | 4               |
| 0,8                       | 0                            | 0               | 0               | 0               | 0          | 0               | 1               | 4               | 0            | 0               | 0               | 2               |
| 1,0                       | 0                            | 0               | 0               | 0               | 0          | 0               | 0               | 0               | 0            | 0               | 0               | 1               |
| 1,5                       | 0                            | 0               | 0               | 0               | 0          | 0               | 0               | 0               | 0            | 0               | 0               | 0               |

Erklärung: 0 = kein Wachstum; 1 = 1—3 Kolonien; 2 = 4—8 Kolonien; 3 = 9—15 Kolonien; 4 = über 15 Kolonien oder zusammenhängender Kokkenbelag.

Die Überlegenheit des Sulfamethylthiazol gegenüber den zwei anderen Mitteln wird auf den ersten Blick klar. Auch die zwei anderen sind nicht gleich wirksam, ihr Unterschied aber ist erheblich geringer. In dem Versuch mit 10.000 Inoculumeinheiten war die Grenzkonzentration des Sulfamethylthiazol 0,5, die des Sulfapyridin und des Sulfanilamid 0,8 bzw. 1 mg %. Im Falle von 10 Inoculumeinheiten sind die entsprechenden Grenzkonzentration 0,1; 0,5 und 0,5 mg %. *Auf Grund der Ergebnisse steht also fest, dass die Präparate verschiedentlich wirksam sind, aber den Unterschied mit Ziffern anzugeben ist eine sehr verwickelte Aufgabe, die höchstens mit Hilfe von Indexen auf dem Wege über arbiträre Berechnungen gelöst werden kann.*

Wenn die verwendete Methodik nicht sehr genau ist, dann kann der Unterschied zwischen zwei beinahe gleichwirksamen Präparaten — unabhängig davon, ob der Versuch in einem festen oder flüssigen Nährboden durchgeführt wird — entweder nicht nachgewiesen werden oder infolge eines Zufalls grösser erscheinen als er in Wirklichkeit ist. Zur Veranschaulichung der zweiten Möglichkeit dient nachstehendes Beispiel: Verglichen werden zwei Mittel, deren Wirkungsunterschied mit der bakteriostatischen Methode gemessen z. B. 33% beträgt, in den Konzentrationen 0,2; 1,0; 5,0; 25 und 50 mg %. Es kann vorkommen dass das Wachstum der Bakterien von dem stärkeren Präparat genau bei der Konzentration von 4,7 mg % vollkommen gehemmt wird. Dementsprechend wird man in der 5 mg % enthaltenden Röhre kein Wachstum feststellen, in der Röhre mit 1 mg % Konzentration wird aber noch Wachstum beobachtet. Hieraus folgt, dass das schwächere Mittel das Bakterienwachstum nur in einer um ein Drittel höheren Konzentration, bei 6,3 mg % hemmen wird. In der Röhre von 5 mg % werden also die Bakterien noch gedeihen. Sicher wird dieses Wachstum nicht so lebhaft sein wie in der 1 mg % -Röhre des stärkeren Mittels; dieser Unterschied wird aber nicht

ausgedrückt, da das Resultat auf Grund der Grenzkonzentration zahlenmässig angegeben wird. Man wird also sagen, dass die vollkommen hemmende Konzentration für das eine Mittel bei 5 mg % für das andere bei 25 mg % liegt. Diese Angabe lässt das eine Mittel fünfmal so stark wie das andere erscheinen, obwohl es zwischen ihnen kaum einen Wirksamkeitsunterschied gibt.

Wegen dieser Schwierigkeiten ist der genauen bakteriostatischen Wertbestimmung der Sulfanilamidderivate eine Titrierung zugrunde zu legen, wo die Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen Mitgliedern gering sind, ferner empfiehlt es sich, das Gedeihen der Bakterien quantitativ zu messen. Auf Grund dieser Daten wird eine Kurve gezeichnet, von der die geringste das Wachstum vollkommen hemmende Konzentration abgelesen werden kann. Unter solchen Bedingungen machten *Möller* und *Schwarz*,<sup>281</sup> ihre Versuche, ferner *Auhagen*,<sup>5</sup> mit dem *Stereptobakterium plantarum* und verschiedenen pathogenen Keimen (*Ivanovics*<sup>159, 164, 165</sup>). Unser Verfahren ist folgendes:

Die Züchtung der Staphylokokken, Coli-, Dysenterie-, Typhus-, Paratyphus- und Milzbrandbazillen und anderen mässig anspruchsvoller Mikroorganismen erfolgt in einem aus Caseinhydrolysat hergestellten Nährboden, der unter Beobachtung der Erfahrungen *Knights*<sup>195</sup> folgendermassen hergestellt wird.<sup>159</sup>

50 g Casein (nach *Hammerstein*) werden in 250 ccm 4. n Schwefelsäure suspendiert, zwei Stunden im Wasserbad erhitzt, dann der Kolben mit einem Rücklaufkühler versehen, über einem Sandbad weitere 6 Stunden gekocht. Nun wird die Lösung mit 1 Liter dest. Wasser verdünnt, mit heissem, konzentriertem Barytwasser genau neutralisiert, der Niederschlag über einem Büchner—Trichter abgesogen, nach gründlichen Auspressen in 2 Liter heissem Wasser wieder suspendiert und wieder abgesogen. Diese Operation wird mit 1 Liter Wasser wiederholt und die gewonnenen Filtrate werden vermengt. Dem Filtrat fügt man so viel 5. n Schwefelsäure hinzu, dass es auf Kongopapier gerade sauer reagiert. Der stark trüben Lösung wird 1 Esslöffel voll Tierkohle beigegeben, umgerührt, zum Sieden gebracht und in heissem Zustand durch Faltenfilter filtriert. Eine wasserklare, gelbliche Lösung wird gewonnen, der man folgende Stoffe hinzugibt: 3 g Asparagin, 5 g Glutaminsäure, 0,4 g dl-Cystin, 15 g Natriumzitrat, 16 g Glucose, 20 g Kochsalz, 2 Natr. sulfat kryst. Nach Auflösung dieser Stoffe löst man 0,5 g Magnesiumsulfat und 0,02 g Ferriammoniumnitrat getrennt in geringen Wassermengen und fügt diese Lösungen der ersten hinzu. Das pH des Nährbodens wird auf 7,5 eingestellt. Schliesslich wird die Lösung mit 5 mg Aneurinchlorhydrat und 30 mg Nikotinsäureamid versetzt und mit dest. Wasser auf 6 Liter ergänzt. Der Nährboden wird in je 500 ccm Mengen 30 Min. bei 105°, am anderen Tage noch 40 Min. in strömendem Dampf sterilisiert. Von dieser Lösung verdünnt man die gerade nötige Menge mit der gleichen Menge m/15 Phosphatpuffer von pH 7,5 und sterilisiert in Reagenzröhren zu 4 oder 8 ccm in der erwähnten Weise.

Dieser Nährboden gestattet das Gedeihen auch von wenigen Keimen und die Entwicklung der Kultur erreicht ihr Maximum nach 24 Stunden. Die Verdünnung mit dem Phosphatpuffer erhöht die Pufferkapazität des Nährbodens, überdies gewährt der verdünnte Nährboden eine mehr homogene Entwicklung der Bakterien als der konzentrierte. Der bedeutende Zitratgehalt des Nährbodens übt eine Pufferwirkung aus, ferner verhindert dieses Salz die Ausscheidung des Eisens. Selbstverständlich kommt die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate in diesem halbsynthetischen Nährboden besser zur Geltung als in der Fleischbrühe. Dies ersieht man aus Tabelle 12.

Tabelle 12.

**Bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid und Sulfamethylthiazol gegen Staphylokokken in Fleischbrühe und Caseinnährboden.**

| Konz. des Mittels<br>mg 0,0' | Sulfanilamid |              | Sulfamethylthiazol |              |
|------------------------------|--------------|--------------|--------------------|--------------|
|                              | Fleischbr.   | Caseinnährb. | Fleischbr.         | Caseinnährb. |
| 0,0                          | ++++         | ++++         | ++++               | ++++         |
| 2,0                          | ++++         | ++++         | ++++               | ++++         |
| 4,0                          | ++++         | ++           | ++++               | —            |
| 8,0                          | ++++         | ±            | ++++               | —            |
| 16,0                         | ++++         | —            | ++                 | —            |

Bemerkung: Die Kreuze bedeuten den Grad des Wachstums.

Der Unterschied ist noch grösser, wenn die einzelnen Nährböden mit Colibazillen beimpft werden. Dies geht aus Tabelle 13. hervor, wo der Versuch ausser in dem Caseinnährboden und in der Fleischbrühe auch in dem nach den Vorschriften von *Sahyun*<sup>320</sup> und seinen Mitarbeitern hergestellten Glucose und Ammoniumsulfat-Nährboden durchgeführt wurde.

Tabelle 13.

**Bakteriostatische Wirkung des Sulfamethylthiazol gegen Colibazillen in verschiedenen Nährböden.**

| Konz. des Mittels      | Das Wachstum in versch. Nährböden |              |            |
|------------------------|-----------------------------------|--------------|------------|
|                        | Synthetischenährb.*               | Caseinnährb. | Fleischbr. |
| mol/10 <sup>3</sup>    | —                                 | —            | —          |
| mol/10 <sup>4</sup>    | —                                 | —            | ++         |
| mol/5. 10 <sup>4</sup> | —                                 | —            | +++        |
| mol/10 <sup>5</sup>    | —                                 | —            | +++        |
| mol/2. 10 <sup>5</sup> | —                                 | ++++         | ++++       |
| 0 (Kontrolle)          | ++++                              | ++++         | ++++       |

Bemerkung: Die Kreuze bedeuten den Grad des Wachstums.

\* nach *Sahyun* und Mitarbeiter.

Wie ersichtlich, ist die bakteriostatische Wirkung in dem synthetischen aminosäurefreien Nährboden noch ausgeprägter als in dem Caseinnährboden. Dennoch glauben wir, dass man die bakteriostatische Wirkung dieser Mittel selbst im Falle von Colibazillen zweckmässigerweise im Caseinnährboden prüfen soll. Auf die Gründe dieser Ansicht kommen wir später zurück.

Die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate wird nun wie folgt genau titriert: Nachdem die grösste Verdünnung, die das Wachstum der Bakterien vollkommen verhindert, in orientierenden Versuchen annäherend bestimmt wurde, versetzt man vom 8-10-fachen dieser Konzentration die je 4 ccm Casein-nährboden enthaltenden Röhrchen mit 1,0; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,25; 0,2; 0,15 und 0,1 ccm Lösung. Der Röhreninhalt wird mit dest. Wasser auf 5 ccm ergänzt. Von den schlechtlöslichen Sulfanilamidderivaten verwendet man die Lösung: in ihrer Natriumsalze. Zur Beimpfung der Röhrchen wird zunächst eine normal Öse der 24stündigen Schrägagarkultur in 5 ccm Nährlösung suspendiert und aus der Suspension eine Verdünnung von 1:10.000 hergestellt, 0,1 ccm dieser Verdünnung dient als Inoculum. Wir glauben die Inoculummenge mit diesem Verfahren hinreichend standardisiert zu haben. Laut mehreren Bestimmungen bedeutet diese Menge bei Staphylokokken 6.000—8.000, bei Colibazillen 3.000—3.500, bei Ruhrbazillen 6.000—10.000 Keime. Demnach ist die Ordnungsgrösse von dem Stamm und der Spezies unabhängig. Es wäre ganz verfehlt, die Inoculumgrösse in jedem Versuch durch Aussaat über einer Agarplatte mit der Keimzahl anzugeben, zumal über die wirklichen Verhältnisse selbst diese Methode keinen richtigen Aufschluss gibt, da die erhaltene Keimzahl nicht nur von der Art des Bakteriums und dem Stamm, sondern auch davon abhängt, in welchem Ausmass die Suspension homogenisiert werden konnte.

Die beimpften Röhrchen werden nach gründlichem Schütteln 20—30 Stunden in einem Brutschrank aufbewahrt. Der bakteriostatische Titerwert hängt auch von der Züchtungsdauer hochgradig ab. Im kürzeren Versuch (z. B. 14—20 Stunden) erhält man höhere Werte als bei einer längeren Versuchsdauer. Die über 24 Stunden dauernden Versuche liefern aber genauere Ergebnisse, weil die Streuung der Werte, aus denen die Hemmung darstellende Kurve zusammengestellt wird, geringer ist. Bei homogen wachsenden Stämmen wird der Wachstumsgrad nephelometrisch gemessen. Zu diesem Zweck wird bei uns das Leitzsche Universalkolorimeter verwendet. Als Kontrolle dient eine Kultur, die mit dem Präparat nicht versetzt wird. Der Wachstumsgrad wird in Hundertsatz, auf diese Kontrolle bezogen, angegeben.

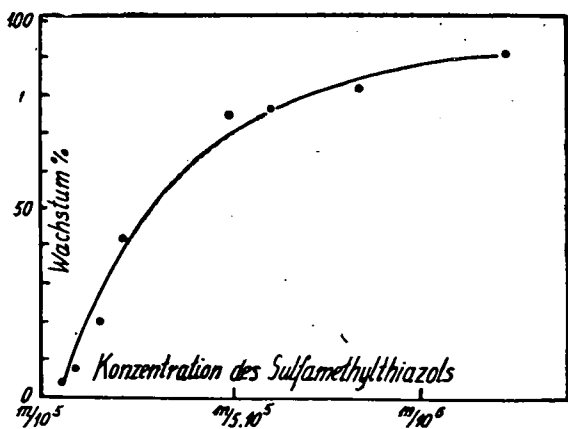


Abb. 5.

Die bakteriostatische Wirkung  
des Sulfamethylthiazols auf *Staphylococcus*.

Abb. 5. stellt die  
Ergebnisse eines Sul-  
famethylthiazolver-  
suches dar.

Die bakteriosta-  
tische Wirksamkeit  
der Präparate kann  
verschiedentlich aus-  
gedrückt werden. Frü-  
her nannten wir Ti-  
terwert die grösste  
Verdünnung, die eine  
66% ige Wachstums-  
hemmung bedingt. Es  
sahen aber zweck-  
mässiger, jene  
höchste Verdünnung  
als Titer anzusehen,  
in der das Wachstum

nephelometrisch überhaupt nicht nachgewiesen werden kann. Selbst-  
rendend ist dieser Wert niedriger als der ersterwähnte.

In Tabelle 14. sind die bakteriostatischen Titerwerte des  
Sulfanilamid und Sulfamethylthiazol auf Grund von *Staphylo-*  
*coccus*versuchen verzeichnet. Um die Wirkung dieser Verbindungen  
anschaulicher zu machen, wurden in der Tabelle auch die Ergebnisse  
von Versuchen mit einigen allbekannten Desinfizierungsmitteln  
angegeben.

Tabelle 14.

**Bakteriostatischer Titer des Sulfanilamid, Sulfamethylthiazol  
und verschiedener Benzolderivate gegen *Staphylococcus aureus*.**

(Der Titer ausgedrückt auf Grund der 66%-igen Hemmung.)

| Das Mittel                   | Bakteriostatischer Titer |
|------------------------------|--------------------------|
| Natriumbenzoat               | mol/200                  |
| Natriumsalicylat             | mol/1.000                |
| Benzolsulfamid-p-carbonsäure | mol/600                  |
| m-Dihydroxybenzol (Resorcin) | mol/50                   |
| Phenol                       | mol/70                   |
| Sulfanilsäures Natrium       | mol/700                  |
| Sulfanilamid                 | mol/20.000               |
| Sulfamethylthiazol           | mol/330.000              |

Wie ersichtlich, wirkt das Sulfanilamid im Caseinnährboden 20-mal, das Sulfamethylthiazol ungefähr 300-mal stärker als das Natriumsalicylat.

Für die Züchtung empfindlicherer Mikroorganismen ist der oben beschriebene Nährboden nicht geeignet. Mit einer Modifizierung ist es aber gelungen, die Mehrheit der von *Lancefield* in die Gruppen B, C und D eingereihten *Streptococcus haemolyticus*-Stämme zu züchten und die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate, ähnlich wie in den obigen Versuchen, auch auf diese Erreger zu bestimmen.

Herstellung des Nährbodens (s. auch *Ivánovics* und *Föllös*<sup>169</sup>) **Nährboden I.:** 50 g Casein werden, in der oben beschriebenen Weise hydrolysiert; die von dem Barium vollkommen befreite Lösung wird auf 3 Liter ergänzt. Aus dieser Stammlösung wird der Nährboden wie folgt zusammengestellt; 200 ccm Hydrolysat, 1 g Glucose, 2 g NaCl, 0,1 g MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O, 0,8 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 H<sub>2</sub>O, 0,1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sörensen*), 0,005 g Ferriammoniumzitrat, 0,5 g dl-Cystin, 0,04 g l-(-)-Tryptophan, Aqu. bideest. ad 1000, pH 7,6. Jetzt wird der Nährboden mit 1 mg Nikotinsäureamid und je 0,2 mg Adermin und Aneurinhydrochlorid versetzt und in 7,8 ccm Mengen schonend sterilisiert. Vor dem Gebrauch gibt man dem Röhreninhalt noch 1 mg Thioglykolsäure und 1, v Ca-pantothenat in je 0,1 ccm Volumen hinzu. **Nährboden II.:** Einem Liter Nährboden wurden ausser den erwähnten akzessorischen Stoffen 0,2 mg Lactoflavin, 0,4 mg Pimelinsäure, je 2 mg  $\beta$ -Alanin, Uracil, Inulin und 1 mg Cholinhydrochlorid hinzugefügt.

Die in die Gruppe B gehörenden *Streptococcus haemolyticus*-Stämme gedeihen schon in dem verhältnismässig einfachen Nährboden I. ganz gut. Für die Züchtung der Gruppe C und D ist nur Nährboden II. geeignet.

Die Messung der bakteriostatischen Wirkung wird wie oben ausgeführt (s. auch *Ivánovics*<sup>164</sup>), mit der Abweichung, dass der Röhreninhalt hier 10 ccm beträgt. Zur Beimpfung der Nährböden wird eine 6-8-stündige Bouillonkultur verwendet. Die noch verhältnismässig homogen wachsenden Stämme werden mit dem auch zu Versuchszwecken verwendeten Caseinnährboden entsprechend verdünnt und aus der Verdünnung in jede Röhre 0,1 ccm eingeführt. Zur Bestimmung des Wachstumsgrades ist hier die Nephelometrie nicht zweckmässig, da die Streptokokkenkulturen nicht entsprechend homogenisiert werden können. Anstatt den Grad der Trübung zu messen, kann auf den Entwicklungszustand der Kultur aus der im

Laufe des Gedeihens entstandenen Säuremenge geschlossen werden. Zu diesem Zweck setzt man nach Ablauf der Versuchsperiode den Kulturen je 2 Tropfen aus einer 0,1%-igen alkoholischen Thymolblaulösung hinzu und titriert mit  $n/10$  NaOH. Aus dem Laugeverbrauch wird die von dem unbeimpften Nährboden verbrauchte Laugemenge abgezogen und aus den Differenzwerten eine die bakteriostatische Wirkung darstellende Kurve gezeichnet. Diese Bestimmungsmethode hat sich als sehr verlässlich erwiesen: In 9 verschiedenen Versuchen mit demselben Streptococcus haemolyticus-Stamm Gruppe B ergaben die Parallelversuche die Extremwerte mol/19000 und mol/25000. Der die Streuung der einzelnen Bestimmungen ausdrückende Mittelfehler (Standarddeviation) wurde  $\pm 11,6\%$  gefunden. Auf Grund von 9 Bestimmungen beträgt der mittlere bakteriostatische Titerwert des Sulfanilamid und sein Mittelfehler mol/21.722  $\pm 832$ . — Wir möchten erwähnen, dass unter ähnlichen Umständen der Titerwert in der Fleischbrühe für mol/900 gefunden wurde.

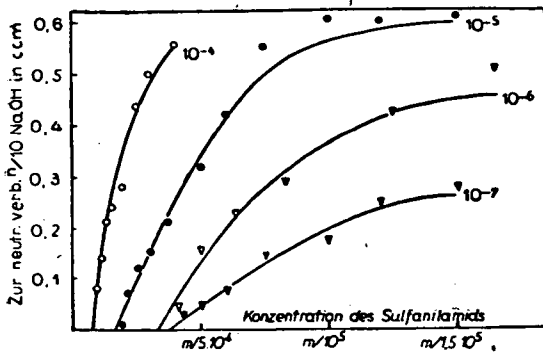


Abb. 6.

**Bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid bei verschiedener Inoculumgröße.** (Str. h. B Nr. 102, im 20stündigen Versuch.)

Bemerkung: Die neben den Kurven angeführten Ziffern geben die Inoculumgröße (ccm Bouillonkultur) an.

Der Zusammenhang zwischen dem bakteriostatischen Titer und der Inoculumgröße wird auf Abb. 6. dargestellt.

Als Versuchsdauer wurden 20—48 Stunden gewählt. Die optimale Versuchsdauer ist, abhängig von der Art des Versuchs, verschieden. Z. B. entspricht den in Gruppe C gehörenden Stämmen der zweitägige Versuch besser als der eintägige, weil der Eintagsversuch zu grosse Streuungen und hierdurch auch eine grössere

Versuchsfehler liefert. Dies erhellt aus Abb. 7.

Das oben beschriebene Verfahren kann nicht nur zur Bestimmung der bakteriostatischen Wirkung, sondern auch zu Versuchen über

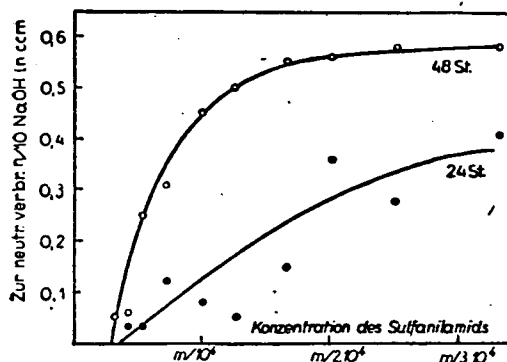


Abb. 7.

**Bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamids in dem 24- und 48stündigen Versuch im Falle von Str. h. C Nr. 170.** (Inoculum:  $10^{-6}$  ccm)

Bestimmung der bakteriostatischen Wirkung, sondern auch zu Versuchen über

Bakterizidie verwendet werden. Man bestimmt in diesem Fall den sog. Desinfiziententiter, d. i. die grösste Verdünnung der Sulfanilamidderivate, die die auf den Nährboden abgeimpften Bakterien ausnahmslos vernichtet. Bei der Titrierung werden, ähnlich wie bei der Bestimmung des bakteriostatischen Titers, verschiedene Konzentrationen des Präparates dem Caseinnährboden hinzugegeben

und die Röhren nach Beimpfung 20—40 Stunden in einem Brutschrank gehalten. Dann werden die Röhren, in denen kein Wachstum erfolgte, mit 1 ccm m/1000 p-Aminobenzoesäure versetzt und weitere 48 Stunden im Brutschrank aufbewahrt. Auf Grund des jetzt abgelesenen Resultates erhält man den „Desinfizientstiter“ des Präparates. Aus Tabelle 15. sind die Einzelheiten des Verfahrens zu sehen.

Tabelle 15.

„Desinfizientstiter“ des Sulfanilamid gegen einem zur Gruppe B gehörenden *Streptococcus haemolyticus*.

| Inoculum<br>(ccm Bouillon<br>Kultur) | Züchtungs-<br>dauer | Einmessung<br>der p-Amino-<br>benzoesäure | Konz. des Sulfanilamid |              |              |               |               |               |
|--------------------------------------|---------------------|---|------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
|                                      |                     |   | mol<br>1.000           | mol<br>2.000 | mol<br>5.000 | mol<br>10.000 | mol<br>15.000 | mol<br>20.000 |
| 10 <sup>-6</sup>                     | 20 <sup>h</sup>     | vor                                       | —                      | —            | —            | —             | —             | —             |
|                                      |                     | nach                                      | +++                    | +++          | +++          | +++           | +++           | +++           |
|                                      | 40 <sup>h</sup>     | vor                                       | —                      | —            | —            | —             | —             | —             |
|                                      |                     | nach                                      | —                      | —            | —            | +++           | +++           | +++           |
| 10 <sup>-5</sup>                     | 20 <sup>h</sup>     | vor                                       | —                      | —            | —            | —             | —             | —             |
|                                      |                     | nach                                      | +++                    | +++          | +++          | +++           | +++           | +++           |
|                                      | 40 <sup>h</sup>     | vor                                       | —                      | —            | —            | —             | —             | +++           |
|                                      |                     | nach                                      | —                      | —            | +++          | +++           | +++           | +++           |
| 10 <sup>-4</sup>                     | 20 <sup>h</sup>     | vor                                       | —                      | —            | ±            | +             | ++            | +++           |
|                                      |                     | nach                                      | +++                    | +++          | +++          | +++           | +++           | +++           |
|                                      | 40 <sup>h</sup>     | vor                                       | —                      | —            | +            | +             | +++           | +++           |
|                                      |                     | nach                                      | —                      | +++          | +++          | +++           | +++           | +++           |

Die Kreuze bedeuten den Grad des Wachstums.

Hieraus ersieht man, dass nach 20 Stunden die Kokken selbst in Anwesenheit von überschüssigem Sulfanilamid nicht getötet wurden, dagegen war in den Röhren nach 40 Stunden selbst im Falle des grössten Inoculums kein einziger lebender Coccus vorhanden. Die Tötung der eingepfachten Kokken erfordert eine zwei-viermal grössere Konzentration als die Bakteriostase.

Ähnliche Versuche wurden auch mit Coli-, Dysenterie-, Typhus- und Paratyphusbazillen vorgenommen, deren Erörterung wir an dieser Stelle unterlassen möchten.

## Mechanismus der direkten Wirkung des Sulfanilamid.

### 1. Morphologische und biologische Zeichen der direkten Wirkung.

Der *Ehrlichsche* Begriff „parasitotrop“ bedeutet eine besondere Affinität des Chemotherapeuticums zum Plasma des Krankheitserregers, wodurch es zu einer elektiven Speicherung des Chemotherapeuticums im Körper des Erregers kommt. Eine Literaturangabe, die über die „parasitotropen“ Eigenschaften der Sulfanilamide Aufschluss geben könnte, wurde nicht gefunden. Nur in der Arbeit von *Bradbury* und *Jordan*<sup>32</sup> findet man einen flüchtigen Hinweis darauf, dass die Sulfanilamide an der Oberfläche der Bakterien, evtl. in spezifischer Weise, angesammelt werden können. *Bradbury* und *Jordan* haben gefunden, dass die Wanderungsgeschwindigkeit der Colibazillen in einem elektrischen Feld durch die Berührung mit Sulfanilamiden geändert wird; während der 350 Minuten dauernden Beobachtung entspricht die Änderung der Geschwindigkeit einer Kurve mit zwei Maximumwerten. Die Verfasser sind der Ansicht, dass diese Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit für die Sulfanilamide charakteristisch und dadurch bedingt sei, dass diese Verbindungen an der Zelloberfläche mit ihrer  $-NH_2^+$ -Polargruppe spezifisch gebunden werden. Obwohl Metanilamid, Anilin, Benzolsulfonamid usw. keine solche typische Änderung der Wanderungsgeschwindigkeit zur Folge haben, glauben wir doch nicht, dass es zwischen den Schwankungen der elektrischen Ladung der Bakterien und der spezifischen Wirkung irgend einen Zusammenhang gebe. Hierfür spricht die Tatsache, dass das *Acetylsulfanilamid* in den Versuchen von *Bradbury* und *Jordan* die Wanderungsgeschwindigkeit ebenso beeinflusste wie das Sulfanilamid; von diesem Mittel ist aber bekannt, dass es auf die Bakterien keine direkte (in vitro) Wirkung hat.

Die *morphologischen Zeichen* der direkten Sulfanilamidwirkung sind recht spärlich, allerdings wurden einige beschrieben. *Vonkenel*, *Kimmig* und *Lembke*,<sup>370</sup> ferner *Gärtner*,<sup>123</sup> haben mit elektronoptischen Untersuchungen nachgewiesen, dass das Plasma der Gonokokken und anderer Bakterien unter Einwirkung der Sulfanilamide verändert wird. Unter dem Elektronenmikroskop ist das Plasma des einer jungen Kultur entnommenen Bakteriums dicht, homogen, strukturlos; hingegen zeigt das der Sulfanilamidwirkung ausgesetzte Bakterium eine charakteristische Struktur auf, überdies sind auch seine Konturen unscharf: es wird dem Bakterium einer alten Kultur ähnlich. *Vonkenel* und seine Mitarbeiter sind der Ansicht, dass es in der Bakterienzelle auf die Wirkung des Sulfanilamid zu einer „frühzeitigen Alterung“ komme.

*Gärtner*<sup>123</sup> trachtete die Zellveränderungen unter dem Fluoreszenzmikroskop unmittelbar zu verfolgen. Er ging von der Beobachtung *Struggers*<sup>352</sup> aus, dass das mit Acridin-Orange gefärbte Bakterium entsprechend seinem Zustand fluoresziert: das lebende erscheint in grüner, das tote in roter Farbe. *Gärtner* hat festgestellt, dass in den verschiedenen Bakterienkulturen, die mit Sulfanilamid



versetzt werden, die Zahl der rot gefärbten Bakterien entsprechend der Konzentration und der Wirkungsdauer des Mittels zunimmt. Mehrere Umstände sprechen aber gegen die Annahme, dass die Lebensfähigkeit der Bakterien in der Fluoreszenzfarbe zum Ausdruck komme. Zunächst sei darauf hingewiesen, dass in den 24—120 Stunden alten Kontrollkulturen *Gärtners* höchstens 1—3% der Bakterien rot fluoreszierten, obwohl die Zahl der toten Bakterien in solch alten Kulturen unbedingt höher ist.<sup>308, 385, 386</sup> In seiner Schlussbemerkung macht er das Geständnis, dass ihm die Beziehungen der Fluoreszenz zur Lebensfähigkeit auf Grund seiner weiterer Forschungen nunmehr als zweifelhaft erscheinen.

Beträchtlich mehr Daten beziehen sich auf die Kapsel- und Kettenbildung der Kokken. *Levaditi* und *Vaisman*<sup>216</sup> (1935) haben die therapeutische Wirksamkeit des Protosil seinen „akapsulogenen“ Eigenschaften zugeschrieben. Später machten auch andere Forscher (*MacIntosh* und *Whitby*,<sup>246</sup> *Telling* und *Oliver*,<sup>358</sup> *Hilles* und *Schmidt*,<sup>147</sup> *Mellon* und *McKinney*<sup>273</sup> die Beobachtung, dass in den Organen der mit Sulfanilamiden behandelten Tiere einzelne Strepto- und Pneumokokken ihre Kapsel verloren haben oder die Kapsel eigenartig verändert wurde. Die Veränderung wird von *MacIntosh* und *Whitby*<sup>246</sup> wie folgt beschrieben: „The capsule of the pneumococcus appears to be enlarged and to have a rough crenated edge.“ Einige Verfasser haben diese Wirkung der Sulfanilamide auch in vitro gesehen, während andere eine Hemmung der Kapselbildung unter keinen Umständen beobachten.<sup>101, 151, 234, 319, 321, 323</sup> Einstimmig wurde aber festgestellt, dass die Strepto- und Pneumokokken unter Sulfanilamidwirkung sowohl im Organismus (*Colebrook* und *Kenny*,<sup>58</sup> *Gay* und *Clark*,<sup>122</sup> *Long*<sup>234</sup> und seine Mitarbeiter, *Schmitt*<sup>328</sup>), wie auch in vitro (*Lockwood*,<sup>227</sup> *Chandler* und *Janeway*,<sup>53</sup> *Hoyt* und *Levine*<sup>151</sup>) längere Ketten bilden als gewöhnlich.

Wir wollen uns mit den Variationserscheinungen, die bei den mit Sulfanilamid behandelten Bakterien von einigen Forschern<sup>147, 212, 147, 363</sup> beobachtet wurden, nicht ausführlich befassen. Es hat den Anschein, dass Variationen ziemlich selten entstehen und nicht stationär werden.

Eine der wichtigsten Fragen vom Gesichtspunkte des Wirkungsmechanismus lautet: *Üben die Sulfanilamide auf den Stoffwechsel der Bakterien eine direkte spezifische Wirkung aus?* Das Problem wurde vor allem mit den Methoden studiert, die sich in der Erforschung der Zelloxydationen bewährt hatten und man versuchte, mit Hilfe der *Warburg*schen, ferner der *Thunberg*schen Technik, in das Problem Einsicht zu gewinnen. Die Beobachtungen sind zum Teil einander widersprechend, was auf die technischen Umstände zurückgeführt werden dürfte. Wir fühlen uns gerade wegen dieser Widersprüche veranlasst, uns mit dem Problem ausführlicher zu befassen.

Die ersten einschlägigen Versuche wurden von *Mellon* und *Bambas*<sup>270</sup> (1937) durchgeführt. Sie untersuchten die Beeinflussung der Dehydrase des *Pneumococcus* Typ 1 durch Sulfanilamide. Die Dehydrierung der Glucose wurde vom Sulfanilamid selbst in einer mol/100 Konzentration nicht beeinträchtigt. Dagegen hemmen die auf den *Pneumococcus* bakterizid wirkenden Stoffe, wie Natriumglycholat, Optochin, Chinin, selbst in grossen Verdünnungen die Glucose-

dehydrierung. Gegen die Staphylococcus-Dehydrase war das Sulfanilamid sogar bei einer Konzentration von 120 mg % (im Falle verschiedener Substrate) unwirksam, die 0,7%-ige Lösung aber übte schon eine geringe Hemmung aus (*Ordal* und *Halvorson*<sup>293</sup>). Nach *MacLeod*<sup>251</sup> wird Glucose vom Pneumococcus bei Vorhandensein von Sulfapyridin ebenso dehydriert wie sonst. Merkwürdigerweise wird aber die Dehydrierung des Glycerin, Lactat und Pyruvat vom Sulfapyridin in einer Verdünnung 1:8000 noch gehemmt. Letztere Beobachtung bedarf noch der Bestätigung, da sie den anderen Literaturangaben widerspricht. Nach *Winkler*<sup>387</sup> übt Sulfanilamid auf Bakterien-Dehydrasen keine Wirkung aus. *Váczi* und *Kiss*<sup>364</sup> haben beobachtet, dass das Methylenblau bei Vorhandensein von Sulfanilamid von den Staphylo- und Streptokokken *rascher entfällt* wird als in den Kontrollröhrchen.

Unter Anwendung der *Warburgschen* Technik wurde der Sauerstoffverbrauch der sog. *ruhenden* (d. i. *gewaschenen*) Bakterien unter Sulfanilamidwirkung studiert. Die mit gewaschenen Bakteriensuspensionen vorgenommenen Versuche wurden, abgesehen von wenigen Abweichungen, mit übereinstimmenden Ergebnissen abgeschlossen: *Die Atmung der Suspensionen wird vom Sulfanilamid nicht wesentlich gehemmt; eine milde Hemmung wurde von einigen Verfassern beobachtet.* *Barron* und *Jacobs*<sup>9</sup> haben festgestellt, dass die Atmung der gewaschenen Suspensionen der Coli- und Friedländerbazillen, Gono- und Streptokokken, vom Sulfanilamid (mol/100 Konzentration) überhaupt nicht oder höchstens um 8—23% gehemmt wird. *Lajos*<sup>299</sup> stellte Versuche mit den gewaschenen Suspensionen der zu verschiedenen Typen gehörenden Pneumokokken an; als Substrat wurde Glucose oder Lactat und Pyruvat verwendet. Bei Vorhandensein von 0,001% Sulfapyridin wurde der Sauerstoffverbrauch, entsprechend den verschiedenen Versuchen, um 9—54% herabgesetzt. Eine geringfügige Hemmung der Atmung der gewaschenen Suspensionen wurde auch von *Váczi* und *Kiss*<sup>364</sup> beobachtet; das Sulfamethylthiazol hatte 26%, Sulfapyridin 15%, Sulfanilamid 13% Hemmung zur Folge. *Váczi* und *Kiss* verwendeten ziemlich hohe Konzentrationen der geprüften Verbindungen (500 mg %). Nach *Hirsch*<sup>148</sup> werde die Atmung der ruhenden Staphylokokken vom Sulfamethylthiazol bis zur Konzentration 1:3.900 nicht beeinflusst, während Desinfizierungsmittel, wie Rivanol oder Sublimat, schon in erheblich niedrigeren Konzentrationen wirksam sind. Ausser den erwähnten haben auch *Schörling*<sup>330</sup>, *Frei*<sup>111</sup>, *Winkler*<sup>387</sup> ferner *Kohn* und *Harris*<sup>197</sup> festgestellt, dass die Atmung der ruhenden Hefezellen oder Bakterien von dem Sulfanilamid überhaupt nicht oder nur unwesentlich beeinträchtigt wird. Mithin lässt sich als Tatsache festlegen, *dass die Sulfanilamide auf die Atmungsfermente der Bakterien keine spezifische Hemmung entfalten.* Die bei der Anwendung von hohen Konzentrationen beobachtete geringfügige Hemmung dürfte kaum als spezifisch angesehen werden.

Im Gegensatz hierzu *wird der Sauerstoffverbrauch der gedeihenden Bakterien von den Sulfanilamiden selbst in grossen Verdünnungen erheblich herabgesetzt.* Von diesem Gesichtspunkt aus sind besonders die systematischen Studien von *Hirsch*<sup>148</sup> beachtenswert. Nach seiner Feststellung seien Wachstum und O<sub>2</sub>-Verbrauch in der

logarithmischen Phase streng parallel. Darum eigne sich die Warburgsche Methode ganz besonders für die Erforschung der einzelnen Phasen der Sulfanilamidwirkung. *Von der Kurve des Sauerstoffverbrauches kann die Wachstumsintensität für jeden Zeitpunkt des Versuchs abgelesen werden. Mit der allmählichen Steigerung der Sulfanilamidkonzentration wird die Kurve immer flacher, und von einer gewissen Konzentration an verläuft sie schon parallel zur Abszisse: die Atmung der Kultur wird stationär wie die der ruhenden Bakteriumsuspension.* Die weitere Erhöhung der Konzentration wirkt ebenso wenig, wie das Sulfanilamid, das der gewaschenen Suspension zugefügt wird. Aus dieser Beobachtung schliesst Hirsch, dass das Sulfanilamid die Atmungsfermente, die die lebenswichtigen Funktionen der Bakterien (Katabolismus) regeln, nicht schädigt, nur die Plasmasynthese (Anabolismus) hindert. Nach Erreichung der Sulfanilamidkonzentration, die die Plasmasynthese vollkommen verhindert, ist jeder weitere Sulfanilamid-Überschuss unwirksam. *Dagegen haben die desinfizierenden Mittel (z. B. das Rivanol), entsprechend ihren steigenden Konzentrationen, ein fortschreitendes Absterben der Zellen zur Folge, ohne die Reproduktionszeit der überlebenden wesentlich zu beeinflussen; hier ist also der Katabolismus gehindert, während der Anabolismus unbeeinträchtigt vor sich geht.* Zu einem ähnlichen Schluss gelangten auf Grund ihrer Versuche Kohn und Harris.<sup>197</sup> In sorgfältig ausgeführten Versuchen haben sie festgestellt, dass bei einer milden Sulfanilamidwirkung der Sauerstoffverbrauch der sich vermehrenden Bakterien und ihre Wachstumsintensität genau parallel abnehmen und bei den niedrigen Sulfanilamidkonzentrationen ( $m/10^{-4}$ — $10^{-5}$ ) der Sauerstoffverbrauch der einzelnen Bakterien nicht geringer ist als in den Kontrollröhren. Somit liegt dem geringeren O<sub>2</sub>-Verbrauch allein die geringere Wachstumsintensität zugrunde. Bei höheren Konzentrationen ist die Atmung der Bakterien anscheinend weniger intensiv, wahrscheinlich wegen der unspezifischen Wirkung des Mittels. Hiervon ausgehend behaupten Kohn und Harris, dass das Sulfanilamid nicht die Atmung der Bakterien, sondern lediglich die Plasmasynthese hemmt.

Entgegen diesen sorgfältigen Versuchen behauptet Illényi,<sup>154</sup> dass das Sulfanilamid unmittelbar auf die Bakterienatmung einwirke, obwohl die von ihm beobachtete Atmungsabnahme zum Teil auch durch die Bakteriostase bedingt sein könne. Illényi versetzte den Agarnährboden mit 0,1%, also einem ziemlich konzentrierten Sulfanilamid, dann beimpfte er den Nährboden mit den Bakterien. Nach 24 Stunden war der Sauerstoffverbrauch um 52% geringer als in der Kontrollkultur. Er gibt allerdings zu, dass der Unterschied zum Teil auf das langsamere Wachstum zurückgeführt werden könne. Wir sind der Ansicht, dass nach Abzug dieses Faktors nur ein unbedeutender Unterschied zurückbleibt. Diese mässige Abnahme des Sauerstoffverbrauches dürfte kaum durch die spezifische Sulfanilamidwirkung bedingt sein, da der Verfasser die Abnahme nach solch hohen Konzentrationen beobachtete, die therapeutisch nicht in Betracht kommen.

Demnach lassen sich die mit der oxydativen Fähigkeit der Bakterienzelle gemachten Beobachtungen, in dem Sinne auswerten, dass die direkte Sulfanilamidwirkung nicht auf die das Leben des Plasmas sichernden Systeme, sondern auf die an dem Aufbau des

*Plasmas beteiligten Fermente gerichtet sei; dementsprechend komme diesen Mitteln nicht eine bakterizide, sondern eine bakteriostatische Wirksamkeit zu.* Schon die ersten Versuche sprachen für eine bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide. Es gab aber Verfasser, die die antibiotischen Eigenschaften der Präparate Bakterizidie nannten. Besonders die Forscher, die ihre Versuche unter besonderen Bedingungen ausführten (z. B. bei höherer Temperatur), glaubten eine bakterizide Wirkung beobachtet zu haben. In dieser Beziehung dürfte der im Blut oder Serum beobachteten bakteriziden Wirkung keine Bedeutung zukommen, da hier ausser den Präparaten auch andere Faktoren mitwirken: Die Ergebnisse werden von den bakteriziden Stoffen des Serums und auch von den Leukozyten beeinflusst. Dass die Bakterien, die mit einem Sulfanilamidpräparat lange in Berührung stehen, zugrunde gehen, wurde auch von uns veranschaulicht (Tabelle 15.). Auf Grund ähnlicher Versuche wird den Sulfanilamiden auch heute noch vielerorts eine bakterizide Wirkung zugeschrieben. Die *primäre* Sulfanilamidwirkung ist keine bakterizide, sondern eine bakteriostatische Wirkung. Dies erhellt nicht nur aus den besprochenen Respirationsversuchen, sondern auch aus anderen Beobachtungen. Dennoch wurden schon im Jahre 1940 Versuche veröffentlicht, die als Beweise der Bakterizidie aufgefasst wurden. So behauptet z. B. *Libby*,<sup>220</sup> dass die nephelometrische Bestimmung der Zahl der in den sulfanilamidhaltigen Nährböden gezüchteten Bakterien von der durch Keimzählung erhaltenen schon kurz nach der Beimpfung abweicht. Diese Differenz nimmt mit der Versuchszeit allmählich zu. Den Grund hierfür erklärt er damit, dass ein Teil der Bakterien infolge der bakteriziden Sulfanilamidwirkung ständig getötet wird und, da diese aus der Fortpflanzung ausgeschaltet werden, das Wachstum der ganzen Kultur sich allmählich verlangsamt.

Entgegen dieser Behauptung sprechen zahlreichen frühere Beobachtungen dafür, dass es sich um eine bakteriostatische Wirkung handelt und in diesem Sinne lassen sich auch die Atmungsversuche auswerten. Nun können aber alle Gegenansichten durch die 1941 veröffentlichten Ergebnisse von *Kohn* und *Harris*<sup>197</sup> widerlegt werden. Sie haben nämlich eine die Vermehrung der Bakterien ausdrückende Konstante ermittelt, wodurch diese Frage fast mit der Exaktheit der chemischen Kinetik studiert werden konnte. Sie bestimmten die Geschwindigkeit des Bakterienwachstums für die einzelnen Versuchsphasen mit Hilfe der Keimzählung und photometrisch. Die Versuche wurden mit Colibazillen, parallel in einem synthetischen, aus einem Glucose-Salzgemisch bestehenden Nährboden und Peptonwasser angestellt. Im ersten Nährboden verlangt das Bakterienwachstum, also die Plasmasynthese, eine synthetische Höchstleistung (maximal synthetic effort) von der Zelle, während in dem Peptonwasser, wo die Zelle einen Teil ihrer Bausteine in fertigem Zustand bekommt, die Synthese vom *Bacillus* eine erheblich leichtere Aufgabe verlangt. Die Verfasser geben die Wachstumsintensität, auf einen gewissen Zeitpunkt bezogen, mit der Konstante der Wachstumsgeschwindigkeit an. Diese Zahl bedeutet den Prozentsatz der sich zur betreffenden Zeit im Laufe einer Minute teilenden Bakterien. Auf diese Weise haben sie festgestellt, dass die Bakterien sich am

Anfang des Versuches in der Anwesenheit des Sulfanilamid mit derselben Geschwindigkeit vermehren wie in den Kontrollröhren. Die bremsende Wirkung des Sulfanilamid erscheint erst nach dem Ablauf von 60—100 Minuten; dann verlangsamt sich allmählich die Teilungsgeschwindigkeit und die maximale Hemmung tritt — entsprechend der Sulfanilamidkonzentration — nach 3—4 Stunden ein. Ist die Sulfanilamidkonzentration hoch, so kann die Geschwindigkeitskonstante mit dem Eintritt der maximalen Hemmung nahe Null sein, d. h. das Wachstum kommt zu einem Stillstand. *Merkwürdigerweise ist der Eintritt der Bakteriostase von der Inoculumgröße, innerhalb einer gewissen Grenze, unabhängig; die Wachstumsgeschwindigkeit wird im Falle eines kleinen und eines grossen Inoculums gleicherweise gehemmt. Da aber diese maximale Hemmung erst nach einer gewissen Latenz allmählich eintritt, können am Ende der Latenzzeit die Bakterien so viel Teilungen durchgemacht haben, dass die Kultur-dichte der einer sich hemmunglos entwickelnden Kultur entspricht.* Ähnliche Beobachtungen machten auch Rose und Fox,<sup>311</sup> der Colibacillus macht in einem synthetischen Nährboden bei  $5 \times 10^{-4}$  Sulfanilamidkonzentration bis zum Stillstand der Vermehrung 5,6—7,1 Teilungen durch. Dies bezieht sich gleicherweise auf das kleine und das grosse Inoculum. Nach Kohn und Harris hänge die durchschnittliche Fortpflanzungsgeschwindigkeit von der Konzentration des Sulfanilamidpräparates — und auch von der Art des Präparates — ab.

Daraus folgt: *die direkte Wirkung der Sulfanilamidderivate richtet sich gegen die Fortpflanzung der Bakterien, also gegen die Fermentsysteme, die nicht den individuellen Stoffwechsel, sondern die Plasmasynthese d. h. die Reproduktion katalysieren.* Diese Hemmung kommt aber erst nach einer gewissen Latenzzeit zur Geltung. Schliesslich gehen die Bakterien im Gefolge dieser primären Wirkung zugrunde. Es sei ausdrücklich darauf hingewiesen, dass es sich nur um eine scheinbare Bakterizidie handelt, die durch das Aufhören der Plasmasynthese bedingt, also als eine sekundäre Wirkung anzusehen ist. Auf die Einzelheiten diese Problems kommen wir noch zu sprechen.

## 2. Ist das p-Aminobenzolsulfonamid Träger der direkten Wirkung?

Die Frage erscheint seltsam, nachdem die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamidderivate im vorigen festgestellt wurde. Im folgenden wird es sich zeigen, dass die Frage dennoch auf Grund gewisser Beobachtungen lange berechtigt war. Die Ansicht, dass eigentlich nicht das p-Aminobenzolsulfonamid, sondern sein im Organismus oder im Reagenzglas entstehendes Produkt die Wirkung ausübe, wurde zum ersten Mal 1937 von Mayer<sup>268</sup> betont. Er hat gefunden, dass die Streptokokkensepsis der Maus von dem p-Nitrobenzolsulfonamid ( $O_2N \cdot C_6H_4 \cdot SO_2NH_2$ ) besser beeinflusst wird als vom Sulfanilamid, ferner, dass diese Verbindung im Reagenzglas vollkommen unwirksam ist, während das Sulfanilamid unter denselben Umständen bis zur Verdünnung 1:5000 bakteriostatisch wirkt. Den auffallenden Unterschied zwischen der

In-vivo- und In-vitro-Wirkung wollte er mit der Annahme erklären, dass keiner dieser Stoffe das wirksame Prinzip darstelle, sondern eines von ihren gemeinsamen Oxydations- bzw. Reduktionsprodukten. Folgende Verbindungen kommen in dieser Beziehung in Betracht: p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid, p-Hydrazobenzolsulfonamid, p-Azoxybenzolsulfonamid, p-Nitrosobenzolsulfonamid. Von diesen Verbindungen war in vitro das p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid die wirksamste. Ihre *bakterizide* Wirkung war in Serumbouillon und in wässrigem Medium 10—100-mal stärker als die des Sulfanilamid weshalb angenommen wurde, dass diese Verbindung das wirksame Umwandlungsprodukt darstelle. Da im Organismus das p-Nitrobenzolsulfonsäureamid besser wirkt als das Sulfanilamid, werde die erste Verbindung im Organismus leichter zum Hydroxylamin verwandelt als die zweite. Diese Auffassung fand zahlreiche Anhänger, besonders unter den amerikanischen Verfassern. *Mellon* und seine Mitarbeiter versuchten sogar, der direkten Sulfanilamidwirkung obige Theorie zugrunde zu legen.

Nach *Shaffer*<sup>339, 340</sup> besitzt das oxydierte Sulfanilamid (das Hydroxylamino oder Nitroso Analogon) sowohl unter aeroben wie auch unter anaeroben Verhältnissen eine energische bakterizide Wirkung, während das Sulfanilamid über diese Eigenschaft nur in geringem Ausmasse verfügt. Er beobachtete ferner, dass das p-Nitrobenzolsulfonamid vom Gewebsbrei zum entsprechenden Hydroxylamin reduziert wird. Ohne dem Sulfanilamid seine Wirksamkeit absprechen zu wollen, hält er diese Substanz für weniger wirksam als ihr Oxydationsprodukt. *Fox*<sup>108, 109</sup> war der Ansicht, dass die Latenzzeit, nach deren Ablauf die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid zur Geltung kommt, für die Oxydation des Sulfanilamid zu einem wirksamen Stoff nötig sei. Aus demselben Grund nehme der Wert des Oxydationspotentials in den sulfanilamidhaltigen Kulturen ab, während er in den Kontrollkulturen ansteige. Schliesslich behauptet er — andere Verfasser konnten aber diese Auffassung nicht bestätigen — dass das Sulfanilamid bei vollständiger Anaerobiose nicht wirksam sei. Für seine Auffassung schien die Tatsache zu sprechen, dass die bakteriostatische Wirkung des p-Hydroxylaminobenzolsulfonamids sofort, ohne Latenzzeit zur Geltung kommt.

*Mellon, Shinn, Main und Locke*<sup>224, 225, 226, 255, 256, 257, 341, 342, 343</sup> haben nach serienweisen Studien den Standpunkt eingenommen, dass das p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid sowohl in vitro als auch in vivo gebildet wird. Auch die mit ultravioletten Strahlen behandelte Sulfanilamidlösung wird zum Teil zu dieser Verbindung oxydiert. Die Mengen des gebildeten Hydroxylamins verhalten sich wie die Bestrahlungszeiten. Die entstandene Menge könne einige Prozente der Muttersubstanz betragen. Eine ähnliche Verwandlung des 4,4'-Diaminodiphenylsulfons wurde ebenfalls festgestellt, hingegen konnten sie den Prozess für das Sulfapyridin nicht nachweisen. Zur quantitativen Bestimmung des p-Hydroxylaminobenzolsulfonamids wurde das *Rosenthal-Baur*sche<sup>315</sup> kolorimetrische Verfahren herangezogen.

Die Annahme, dass aus dem Sulfanilamid in dem Organismus bzw. der Bakteriumzelle das entsprechende Hydroxylamin entsteht, erklärt, nach *Mellon* und seinen Mitarbeitern, auch den Wirkungs-

mechanismus der Sulfanilamidderivate. *Blaschko*,<sup>23</sup> *Keilin*,<sup>183</sup> ferner *Sevag*<sup>337</sup> und ihre Mitarbeiter haben Mitte der dreissiger Jahre den hemmenden Einfluss der Hydroxylamine auf die Katalasewirkung festgestellt. Auf diesen Ergebnissen fusst die Annahme von *Mellon* und seinen Mitarbeitern, dass die Zersetzung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  das im Verlaufe der aeroben Bakteriumatmung entsteht, von dem Sulfanilamid bzw. seinem Oxydationsprodukt, dem entsprechenden Hydroxylamin, verhindert werde. Im Gefolge der Antikatalasewirkung komme es im Bakteriumleib zur Peroxydansammlung, die die Zelle schliesslich töte. *Mellon* und seine Mitarbeiter glaubten, diese Auffassung experimentell bewiesen zu haben, denn sie fanden, dass die mit Sulfanilamid versetzten Bakterienkulturen mehr Peroxyd enthalten als die Kontrollen. Die Peroxydansammlung war noch ausgeprägter, wenn die Kulturen nicht mit Sulfanilamid, sondern mit p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid versetzt waren. Ferner wurde die Peroxydansammlung auch in den Fällen beobachtet, wo die Hydroxylamino-Gruppe nicht am Stickstoffatom des aromatischen Kerns ( $\text{N}^4$ ), sondern am  $\text{N}^1$ -Atom der Sulfonamidgruppe ausgebildet war.<sup>258</sup> Desgleichen waren auch die Verbindungen vom Typ  $\text{R} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{NHOH}$  wirksamer (R bedeutet irgend ein Acyl-Radikal, z. B. Caproyl, Valeryl oder Heptoyl). Auch das p-Methylbenzolsulfohydroxamid ( $\text{CH}_3 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{NHOH}$ ) führte zu Peroxydanhäufung. Die Verfasser behaupten, dass alle diese Verbindungen selbst im Falle sehr grosser Inocula (z. B. 0,1 ccm Pneumokokken-Fleischbrühenkultur) bakterizid wirken und diese Wirkung ausschliesslich durch die Peroxydanhäufung bedingt sei. Ausser ihnen hat auch *Lajos*<sup>209</sup> eine mässigere Peroxydanhäufung beobachtet, während *Fuller*<sup>116</sup> in den Sulfanilamid enthaltenden Kulturen nur so viel  $\text{H}_2\text{O}_2$  fand wie in den Kontrollen.

Mit dem oben Angeführten stehen auch die Beobachtungen von *Burton*<sup>38</sup> und seinen Mitarbeitern in Einklang. Sie prüften die In-vitro-Wirkung des p-Hydroxylaminobenzolsulfonamids gegen zahlreiche Krankheitserreger in Parallelversuchen mit Sulfanilamid und Sulfapyridin. Auffallenderweise konnten sie aber die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid weder in Fleischbrühe noch im Agarnährboden, ausgenommen gegen Diphtheriebazillen und Pneumokokken, nachweisen. Sogar die Verdünnung 1:500 war nicht imstande, die Entwicklung der verschiedenen Bakterien zu verhindern. Hinsichtlich der Inoculumgrösse teilen die Verfasser nichts mit, darum ist es sehr fraglich, ob die Versuche den im vorigen Kapitel besprochenen Bedingungen entsprachen. Im Gegensatz zur schwachen Wirkung des Sulfanilamid wurde das Wachstum der verschiedenen Bakterienarten vom p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid bis zur Verdünnung 1:1.000—1:3.500 gehemmt. Die entsprechende Nitroverbindung war etwas schwächer wirksam.

Nach unserer Ansicht sind die meisten hier angeführten Versuche zum Vergleich der *bakteriostatischen* Wirkung des Sulfanilamids und des p-Hydroxylaminobenzolsulfonamids aus technischen Gründen ungeeignet. Die Technik der Verfasser entsprach in den meisten Fällen nur für die Bestimmung der *bakteriziden* Wirkung. Einige, wie z. B. *Mayer*,<sup>208</sup> ferner *Bratton*<sup>34</sup> und seine Mitarbeiter, sprechen im Zusammenhang mit der antibiotischen Wirkung des Sul-

fanilamids und des p-Hydroxylaminobenzolsulfonamids ausdrücklich von einer bakteriziden und nicht von einer bakteriostatischen Wirkung. Zwar behaupten *Burton*<sup>38</sup> und seine Mitarbeiter, die bakteriostatische Wirkung dieser Präparate gemessen zu haben, sind wir auf Grund ihrer Versuchstechnik der Ansicht, dass auch sie die bakteriziden Eigenschaften der Verbindungen prüften. Hieraus glauben wir darauf schliessen zu dürfen, dass *das Sulfanilamid hinsichtlich Bakterizidie dem p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid nachsteht, wobei die angeführten Versuche in bezug auf die bakteriostatischen Eigenschaften der zwei Verbindungen keinen entsprechenden Aufschluss geben.*

Die Auffassung von *Mayer, Mellon*, seiner Mitarbeiter und ihren Anhängern wurde mit heftigen Widersprüchen aufgenommen. In Erwiderung wurden zahlreiche Versuche und Argumente angeführt, um diese Theorie zu widerlegen. Die Argumente lassen sich in nachstehenden Punkten zusammenfassen: 1. Keine einzige Tatsache beweist, dass aus dem Sulfanilamid im Organismus p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid entstehe. *Thorpe, Tecwyn* und *Shellswell*<sup>39</sup> konnten das Vorhandensein dieses Stoffes im Urin trotz systematischer Untersuchungen nicht nachweisen. Sie sprechen der *Rosenthal-Bauerschen Reaktion*<sup>35</sup> jedwede Spezifität ab, weshalb ihre positiv ausgefallenen Versuche jeder Beweiskraft entbehren. Nach *Thorpe* und seinen Mitarbeitern sei das Oxydationsprodukt des Sulfanilamid nicht das Hydroxylamin, sondern verschiedene Hydroxybenzolderivate. 2. Im Organismus sind die Bedingungen der Entstehung des Hydroxylamins überhaupt nicht gegeben, sogar die eingeführte Verbindung wird ausserordentlich rasch abgebaut. *Bratton, White* und *Marshall*<sup>34</sup> beobachteten, dass 40% des dem Blute hinzugegeben Hydroxylamins schon nach 5 Minuten verschwanden. 3. Auch die Antikatalase-Theorie von *Mellon* und seinen Mitarbeitern ist nicht haltbar, da *das Sulfanilamid auch auf solche Bakterien wirkt, die Peroxyd nicht erzeugen und keine Katalase besitzen*, ferner, weil die Sulfanilamidwirkung unter anaeroben Verhältnissen unverändert zur Geltung kommt (*Bliss* und *Long*,<sup>27</sup> *Broh-Kahn*,<sup>36</sup> *Winkler* und *Julius*,<sup>38</sup> obwohl hier die Voraussetzungen der Peroxyd-erzeugung nicht gegeben sind. Besässe das Sulfanilamid nur eine Antikatalase-Wirkung, so wäre es gegen die hämolytischen Streptokokken, die Shiga- und Flexnerbazillen unwirksam, da in diesen Bakterien keine Katalase enthalten ist.<sup>360</sup> Nun wirkt aber das Sulfanilamid auf diese Bakterien ebenso energisch oder noch energischer als auf die katalasehaltigen Coli-, Schmitz-, Sonnebazillen usw. Wäre vom Gesichtspunkte der Sulfanilamidwirkung die Antikatalase-Eigenschaft wesentlich, so würde jedes Hydroxylaminderivat chemotherapeutisch wirksam sein; hierfür aber wurden bisher keine Beweise erbracht. 4. Das p-Hydroxylaminobenzolsulfonamid müsste im Organismus schon deshalb unwirksam sein, weil seine Antikatalase-Wirkung von den Eiweisskörpern in reversibler Weise behoben wird.<sup>338</sup>

Nach diesen besteht heute kein Zweifel darüber, dass die chemotherapeutische Wirkung vom Sulfanilamid und nicht von einem seiner Umwandlungsprodukte ausgeübt wird. Gegen die Antikatalase-Theorie von *Mellon* und seinen Mitarbeitern spricht ausser den



angeführten Argumenten auch der Umstand, dass die Wirkung des p-Hydroxylaminobenzolsulfonamids von der p-Aminobenzoesäure nicht aufgehoben wird (*Green* und *Bielschowsky*<sup>129</sup>), obwohl diese Verbindung die Sulfanilamidwirkung in vivo und in vitro gleichweise aufhebt.

### 3 Die mit den Sulfanilamidderivaten zusammenhängenden Interferenzerscheinungen.

Im Laufe der Studien über die Wirkungsweise der trypanoziden Chemotherapeutica hat sich die Wichtigkeit der sog. Arznei-Interferenzerscheinungen gezeigt. Die Erscheinung wurde zuerst von *Browning* und *Gulbransen*<sup>37</sup> 1922 beschrieben, nachdem sie beobachtet hatten, dass die heilende Wirkung des Trypaflavin auf die Nagana-Infektion von Parafuchsin neutralisiert wird. Später wurden zahlreiche ähnliche Beobachtungen gemacht in bezug auf die Wirkung der Arsenverbindungen und der Anilinderivate. Mit diesen Beobachtungen, von denen die wichtigsten von *Voegtlin*<sup>367</sup> und seinen Mitarbeitern, ferner von *Jancsó* und *Jancsó*<sup>174, 175</sup> gemacht wurden, wollen wir uns hier nicht ausführlich befassen, wir möchten nur darauf hinweisen, dass die Bedeutung der Arznei-Interferenz auch in der Erforschung der Wirkung der Bakterien-Chemotherapeutica bewiesen wurde. Während die mit den trypanoziden Mitteln zusammenhängenden Interferenzerscheinungen vorwiegend in Titerversuchen untersucht wurden, hat man die Interferenz der Sulfanilamid-derivate fast ausschliesslich im Reagenzglas beobachtet und ausführlich erforscht. Wie gezeigt werden soll, brachte die Analyse dieser Erscheinung eine entscheidende Wendung in der Erkenntnis vom Wirkungsmechanismus der Sulfanilamid-derivate, weshalb die Prüfung der Einzelheiten dieses Problems unerlässlich erscheint.

Bei der Besprechung der bakteriostatischen Sulfanilamidwirkung wurde bereits betont, dass diese Eigenschaft von den Versuchsbedingungen hochgradig beeinflusst wird. Auf die hemmende Wirkung der aus dem tierischen Organismus hergestellten Stoffe (Pepton, Organextrakte) wurde besonders hingewiesen. Die Erscheinung wurde Antisulfanilamid- oder Sulfanilamid-Antagonistenwirkung genannt und vom Gesichtspunkte des Wirkungsmechanismus wurde ihr schon längst eine grosse Bedeutung zugeschrieben. Heute scheint die Bezeichnung Arznei-Interferenz um so mehr begründet zu sein, als die Erscheinung bekanntlich auch im lebenden Organismus vorkommt.

*Lockwood*<sup>227, 228</sup> hat die im Jahre 1938 zum ersten Male beobachtete Antisulfanilamidwirkung des Peptons zur Erklärung des Wirkungsmechanismus dieser Verbindung schon damals herangezogen. Nach seiner damaligen Ansicht komme die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid in der Weise zustande, dass das Präparat die die komplexen Eiweisskörper abbauenden Fermente vergifte; bei Vorhandensein des Peptons können die Bakterien darum gedeihen, weil die fehlenden Eiweisabbauprodukte aus dem Pepton, also auf exogenem Wege, ersetzt werden. Nun üben aber die Sulfanilamide auf die proteolytischen Fermente keinerlei Wirkung aus (*Fuller* und *Cole-*

*brook*,<sup>117</sup> *Abderhalden*<sup>1)</sup> weshalb die 1939 publizierte Erklärung von *McIntosh* und *Whitby*<sup>216</sup> anscheinend richtiger ist als die Auffassung *Lockwoods*. Letztere haben die Sulfanilamidwirkung wie folgt charakterisiert: „Sulphanilamide drugs are not simple germicides. They probably act by neutralisation of some metabolic function of enzymatic action.“

*Stamp*<sup>348</sup> teilte 1939 mit, dass er die Interferenz auch mit Bakterienauszügen zustande bringen konnte. Aus einer gewaschenen Suspension von Streptokokken stellte er mit Ammoniumhydroxyd einen Extrakt her, der die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid stark hemmte. Im Laufe der Konzentrierung und teilweisen Reinigung dieser Extrakte machte er die Feststellung, dass der Hemmstoff ein kleines Molekül besitze. Der konzentrierte Stoff enthält Stickstoff und spricht auf die Ninhydrinprobe stark an. Nach *Stamp* sei dieser Wirkstoff ein wesentlicher Bestandteil des Enzymsystems, das vom Sulfanilamid gehemmt wird. Er glaubt mit Rücksicht auf seine Thermostabilität, dass es sich um ein Coenzym handelt.

Der Beobachtung von *Stamp* kommt deshalb eine Bedeutung zu, weil die Spezifität der Peptoninterferenz von *Fuller* und *Colebrook*<sup>117</sup> bezweifelt wurde. Nach ihnen werde die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide vom Pepton darum herabgesetzt, weil diese Wirkung in einem nährstoffreichen Milieu nicht zur Geltung kommen könne. Die Extrakte von *Stamp* waren aber in solch kleinen Mengen wirksam, dass die Spezifität der Wirkung fast über jedem Zweifel stand. Andere Forscher wurden vor allem durch die Beobachtungen *Stamps* veranlasst, den Mechanismus der Sulfanilamidwirkung auf diesem Wege zu erforschen. Für ähnliche Untersuchungen hält *Green*<sup>127</sup> den *Bac. abortus Bang* für das zweckmässigste „Testobject“, da dieser Krankheitserreger sich langsamer als der *Streptococcus* entwickelt, wodurch sein Gedeihen leichter analysiert werden kann. Auch *Green* konnte aus den verschiedenen Bakterien einen mit der Sulfanilamidwirkung interferierenden Stoff herstellen, den er „P-factor“ („pollulation“ oder „proliferation“ factor) nannte. Obwohl seine Extrakte auch die Entwicklung der Sulfanilamide nicht enthaltenden Kulturen förderten, legte er der Interferenzerscheinung nicht diese, sondern ihre antisulfanilamiden Eigenschaften zugrunde. Vom P-Faktor hat er festgestellt, dass er nicht artspezifisch ist, da er aus den verschiedensten Bakterien hergestellt bzw. isoliert werden konnte.

Das Studium der Interferenz erbrachte Anfang 1940 eine vom Gesichtspunkte des Wirkungsmechanismus der Sulfanilamide aus entscheidende Wirkung. Da die Bierhefe eine ansehnliche Menge von Antisulfanilamid-Stoff enthält, versuchte *Woods*,<sup>393</sup> diesen Stoff aus dem Ammoniumhydroxydextrakt der Bierhefe zu isolieren. Der Hemmstoff geht aus dem wässrigen Auszug bei pH 4,5 in Aether über und lässt sich auf diese Weise konzentrieren und reinigen. Mit dem konzentrierten gereinigten Prinzip stellte er verschiedene Reaktionen an. Durch Oxydation mit Salpetersäure lässt sich seine Wirkung aufheben, durch Acetylierung und Esterifizierung abschwächen. *Auf Grund dieser und anderer Eigenschaften nahm er an, dass der Sulfanilamidantagonist mit einer Aminobenzoesäure oder ihrem Derivat identisch sein könnte. Die Annahme erhielt durch seine weiteren*

*Versuche eine glänzende Bestätigung, indem er nachweisen konnte, dass die p-Aminobenzoessäure die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid sehr stark hemmt; von 1 mol der Säure wird die Wirkung von ungefähr 10.000 mol Sulfanilamid aufgehoben! Die Beobachtungen von Woods wurden kurz darauf im Falle der verschiedensten Mikroorganismen von zahlreichen Verfassern (MacLeod,<sup>252</sup> Weis und Jones,<sup>373</sup> Landy und Wyano,<sup>212</sup> Strauss, Dingle und Finland,<sup>350</sup> Müller,<sup>277</sup> Levaditi,<sup>214</sup> Ivánovics,<sup>159</sup> Kimmig,<sup>185</sup>,<sup>186</sup> Hirsch,<sup>148</sup> Spink und Jermsta<sup>345</sup>) ohne Ausnahme bestätigt. Sie haben festgestellt, dass die p-Aminobenzoessäure die bakteriostatische Wirkung der verschiedensten Sulfanilamidderivate und der Sulfanilsäure (Möller und Schwarz,<sup>281</sup> Ivánovics,<sup>159</sup> Hirsch,<sup>148</sup> Jensen und Schmith<sup>178</sup>) gleicherweise aufhebt. Die Verbindung wirkt aber auf die verschiedenen Antiseptica nicht antagonistisch und die bakteriostatische bzw. antiseptische Wirkung der Benzoessäure, der Salicylate, Phenolderivate, Chinone, Nitrobenzole oder die des Salols bleibt bei Vorhandensein der p-Aminobenzoessäure unverändert. (Ivánovics<sup>159</sup>,<sup>160</sup>) Die gegen das Sulfanilamid gerichtete antagonistische Wirkung der p-Aminobenzoessäure ist für das Molekül kennzeichnend; Woods<sup>393</sup> hat die o-Aminobenzoessäure für unwirksam, die m-Verbindung für kaum wirksam gefunden. Andere (Landy und Wyano,<sup>212</sup> Ivánovics,<sup>159</sup> Hirsch,<sup>148</sup> Kimmig<sup>185</sup>,<sup>186</sup>) fanden beide Isomere für gleich unwirksam. Die Spezifität der Wirkung der p-Aminobenzoessäure geht aus Tabelle 16. hervor, die auf Grund der Literaturdaten zusammengestellt wurde. Um die Wirkung der einzelnen Stoffe vergleichen zu können, wurde die sulfanilamidantagonistische Wirkung der p-Aminobenzoessäure mit 10.000 bezeichnet und die Wirkung der anderen Stoffe hierauf bezogen.*

Als Ergänzung der Tabelle sei erwähnt, dass die verschiedenen Ester der p-Aminobenzoessäurederivate, die eine örtlich anästhesierende Eigenschaft haben, von mehreren Verfassern (Keltch<sup>184</sup> und seine Mitarbeiter, Kimmig<sup>186</sup>) untersucht und mit der p-Aminobenzoessäure gleich wirksam oder etwas schwächer gefunden wurden. Die Ester wirken aber langsamer als die Grundverbindung (Woods), wahrscheinlich darum, weil sie von den Bakterien vorerst verseift werden müssen. Wahrscheinlich ist ihr verschiedener Spaltungsgrad verantwortlich dafür, dass ihre Wirksamkeit verschiedentlich angegeben wird.

*Demnach besitzt die p-Aminobenzoessäure eine sehr starke und weitgehend spezifische Antisulfanilamidwirkung. Diese Wirkung ist an die in para-Stellung befindlichen Amino- bzw. Carboxylgruppe gebunden. Woods führt die von ihm beobachtete schwache Antisulfanilamidwirkung der p-Nitrobenzoessäure darauf zurück, dass die Verbindung zum Teil reduziert wird. Jede Substitution in die Amino- oder Carboxylgruppe des Stoffes hat eine beträchtliche Wirksamkeitsabnahme zur Folge. Darum wirken z. B. das p-Amino-benzoylaminopyridin, die p-Aminobenzoyl-glutaminsäure, p-Aminobenzoyl-aminoessigsäure, das p-Aminobenzamid usw. schwächer als die Grundverbindung. In diesen Derivaten befindet sich die Carboxylgruppe in einer Peptidbindung und die Wirkung kann wahrscheinlich erst nach der Spaltung dieser Bindung entfaltet werden. Hier kann der Grund auch dafür liegen, dass diese Derivate auf die ver-*

Tabelle 16.

*Antisulfanilamidwirkung der p-Aminobenzoesäure und der ihr verwandten Verbindungen auf Grund der Daten von verschiedenen Verfassern.*

Die Wirkung der p-Aminobenzoesäure ist zum Zweck der Vergleichung mit rund 10.000 angenommen.

| Die Verbindung und ihre chemische Struktur   | Antisulfanilamidwirkung | Mikroorganismus  |
|--|-------------------------|--|
| p-Aminobenzoesäure, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$  | 10.000                  |  |
| p-Aminobenzoesäure-aethylester,<br>$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_5$  | 10.000<br>1.200         | Strept. <sup>393</sup><br>Str. b. pl. <sup>207</sup>   |
| p-Aminobenzoesäure-methylester,<br>$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{CH}_3$   | 30                      | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| Novocain, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COO} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$  | 10.000                  | Cl. acet. <sup>319</sup>                               |
| Tutocain*  | 170                     | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| Pantocain*   | 5                       | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| p-Aminobenzamid, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$   | 30<br>100               | Cl. acet. <sup>319</sup><br>Str. b. pl. <sup>207</sup> |
| p-Aminobenzoyl-glycin,<br>$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$  | 160                     | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| p-Aminobenzoyl- $\alpha$ -alaninaethylester,<br>$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH} \cdot (\text{CH}_3) \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{C}_2\text{H}_5$ | 10                      | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| p-Aminobenzoyl-glutaminsäure, (d und l)**  | 300                     | Strept. <sup>165</sup>                                 |
| N-p-Aminobenzoyl-p-aminobenzoesäure, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$  | 2                       | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| 2-(p-Aminobenzoylamino)-pyridin,<br>$\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_5\text{NH}_5$  | 1                       | Strept. <sup>393</sup>                                 |
| p-Aminophenyllessigsäure, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$  | 0                       | Cl. acet. <sup>319</sup>                               |
|  | 0                       | Strept. <sup>212</sup>                                 |
| p-Aminophenylglycin, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CHNH}_2 \cdot \text{COOH}$   | 160                     | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
|  | 0                       | Strept. <sup>212</sup>                                 |
| N-Acetyl-p-aminobenzoesäure,<br>$\text{H}_3\text{C} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$  | 160                     | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| p-Hydroxylaminobenzoesäure (?),<br>$\text{HONH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$  | 1                       | Strept. <sup>393</sup>                                 |
| p-Nitrobenzoesäure, $\text{O}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$  | 1                       | Strept. <sup>393</sup>                                 |
|  | 0                       | Staph. <sup>159</sup>                                  |
|  | 3                       | Cl. acet. <sup>319</sup>                               |
| p-Hydroxybenzoesäure, $\text{HO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$   | 0                       | Strept. <sup>393</sup>                                 |
|  | 0                       | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
|  | 0                       | Staph. <sup>160</sup>                                  |
| p-Toluylsäure, $\text{H}_3\text{C} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$   | 0                       | Strept. <sup>393</sup>                                 |
| p-Aminophenyl-stibinsäure, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SbO}_3\text{H}_2$  | 0, 2                    | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |
| p-Aminophenyl-arzinsäure, $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{AsO}_3\text{H}_2$   | 0                       | Str. b. pl. <sup>207</sup>                             |

Erklärung: Str. b. pl. = Streptobacterium plantarum; Strept. = Streptococcus haemolyticus; Cl. acet. = Clostridium acetobutylicum; Staph. = Staphylococcus aureus.

(?) = die Reinheit der Verbindung war fraglich

\* = Diese Verbindungen sind die Ester der p-Aminobenzoesäure. Ihre Struktur war wegen Raummangel nicht abzubilden

\*\* = siehe die Struktur auf S. 81.

schiedenen Bakterien verschieden wirken. Nach dem Erwähnten ist die aromatisch gebundene Carboxylgruppe eine Voraussetzung für die Antisulfanilamidwirkung; es hat aber den Anschein, dass diese Regel nicht ausnahmslos gültig ist. So wurde z. B. das p-Aminophenylglycin von *Kuhn*<sup>207</sup> und seinen Mitarbeitern für schwach wirksam befunden. Andere Verfasser dagegen (*Landy* und *Wyano*<sup>212</sup>) haben unter anderen Bedingungen die Unwirksamkeit dieser Verbindung beobachtet. Führt man in die Aminogruppe der p-Aminobenzoessäure einen Substituenten ein, so wird die Wirkung wieder schwächer. So ist z. B. die Acetylaminobenzoessäure nur schwach wirksam.

Die Antisulfanilamidwirkung ist für die p-Aminobenzoessäure sehr charakteristisch; ihre Derivate und die mit ihr verwandten Verbindungen sind kaum oder überhaupt nicht wirksam. Es ist noch nicht ganz klar, ob die Substitution in die Amino- oder Carboxylgruppe die Wirkung vollkommen aufhebt. Zweifelsohne nimmt die Wirkung nach der Substitution ab, es fragt sich nur, ob diese Wirkungsabnahme durch die ursprünglichen Eigenschaften der neuen Verbindung oder dadurch bedingt ist, dass die Bakterientätigkeit aus den Derivaten p-Aminobenzoessäure abspaltet.

Mehrere Verfasser prüften die Frage, ob es auch andere Verbindungen gibt, die antagonistisch dem Sulfanilamid wirken. In dieser Beziehung wurden die akzessorischen Stoffe (Vitamine) für unwirksam befunden. *Green*<sup>127</sup> beobachtete in seinen mit *Bac. abortus* Bang durchgeführten Versuchen die Unwirksamkeit des Aneurins, der Nikotinsäure und ihres Amids, ferner erwiesen sich auch das  $\beta$ -Alanin, die Pimelinsäure, Indolelessigsäure, Uracil, Glutamin, Inosit und das Biotin als unwirksam. Im Falle von *Streptococcus*, *Staphylococcus* und *Colibazillen* wiesen Aneurin, Pantothensäure, Adermin, Cocarboxylase, Adenylsäure (*Ivánovics*<sup>160, 167</sup>) keine Antisulfanilamidwirkung auf. *Wood* und *Austrian*<sup>392</sup> haben bei denselben Bakterien die Unwirksamkeit des Nikotinsäureamids, Thiamin und der Cocarboxylase bewiesen. *Harris* und *Kohn*<sup>141</sup> untersuchten vom Gesichtspunkte der Antisulfanilamidwirkung zahlreiche Purin- und Pyrimidinbasen und zahlreiche auch von anderen geprüften, biologisch wichtigen Stoffe; alle waren in den Versuchen inaktiv.

Die Behauptung von *West* und *Coburn*,<sup>375</sup> dass der Cozymase eine Antisulfanilamidwirkung zukomme, steht in scharfem Widerspruch mit den erwähnten negativen Ergebnissen. Andere Verfasser (*Ivánovics*,<sup>159</sup> *Wood* und *Austrian*,<sup>392</sup> *Harris* und *Kohn*<sup>141</sup>) konnten seine Ergebnisse nicht bestätigen. *Wood* und seine Mitarbeiter haben in synthetischem Nährboden die fördernde Wirkung der Cozymase auf das *Staphylococcus*-wachstum beobachtet; sie glauben, dass *West* und *Coburn* die Antisulfanilamidwirkung der Cozymase aus dieser Beobachtung ableiten.

Interessanterweise fand *Johnson*,<sup>180</sup> dass das Urethan (Aethylcarbammat) eine Antisulfanilamidwirkung besitzt. *McIlwain*<sup>243</sup> beobachtete ebenfalls, dass dieser Stoff die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid herabsetzt, die Hemmung war aber so geringfügig, dass sie keineswegs als spezifisch angesehen werden könne. In seinen Versuchen konnte 1 mol Urethan nur die Wirkung von 0,01—1 mol Sulfanilamid neutralisieren. Wenn man berücksichtigt, dass 1 mol p-Aminobenzoessäure die Wirkung von Tausenden der Sulfanilamid-

moleküle aufhebt, so ist diese Wirkung wahrlich als unbedeutend zu betrachten.

Da verschiedene Organextrakte, ferner die Absonderungen von gesunden und kranken Menschen eine Antisulfanilamidwirkung besitzen, dürfte diese Eigenschaft mit ihrem Gehalt an p-Aminobenzoessäure zusammenhängen. Die quantitative Bestimmung der p-Aminobenzoessäure in diesen Stoffen war schon früher und ist noch immer eine wichtige Aufgabe. Prinzipiell kann die Bestimmung ähnliche wie andere biologische Verfahren erfolgen, indem man aus der Wirkung auf die Menge des wirksamen Stoffes schliesst. Wichtig ist dabei, die Versuche in einem Medium (Nährboden) vorzunehmen, das mit diesem Stoff nicht verunreinigt ist. Natürliche Nährböden (Fleischbrühe, Peptonwasser) kommen aus diesem Grunde nicht in Frage, nur die sog. synthetischen Nährböden können sich in diesen Versuchen bewähren. *Es schien besonders der Colibacillus zu diesen Versuchen sich zu eignen, da er auch in sehr einfach zusammengesetzten Nährböden, z. B. in einer nur Glucose und Salze enthaltenden Lösung, gedeiht.* Hiermit dürfte es zusammenhängen, dass der erste Erforscher dieses Problems, MacLeod,<sup>252</sup> seine Versuche mit diesem Bakterium anstellte. Er versetzte einen aus Glucose und Salzmischung hergestellten Nährboden mit so viel Sulfanilamid dass die eingepfimpften Colibazillen sich nicht vermehren konnten, dann fügte er dem Röhreninhalt eine entsperchende Menge des Antisulfanilamidstoffes hinzu und prüfte die Röhren auf Bakterienwachstum nach 24 Stunden. Nach der Prüfung einer Anzahl von Stoffen hat er festgestellt, dass auch das verdaute Casein eine Antisulfanilamidwirkung besitzt, die nicht durch Verunreinigung mit p-Aminobenzoessäure bedingt sein dürfte.

Vor der Besprechung dieser Beobachtung sei noch erwähnt, dass die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide gegen die Colibazillen in dem mit hydrolysiertem Casein hergestellten Nährboden weniger zur Geltung kommt als in der Glucose-Salzmischung. Aus Tabelle 13. (s. Seite 57) ersieht man, dass das Sulfamethylthiazol in der Glucose-Salzmischung (synthetischer Nährboden) am stärksten, im Caseinnährboden weniger stark und in der Fleischbrühe am schwächsten wirksam ist. Die Erscheinung wäre am einfachsten dadurch zu erklären, dass die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide in dem nährstoffreichen Caseinnährboden weniger zur Geltung kommen könne als in der Glucose-Salzmischung. Wäre diese Erklärung richtig, so würde noch immer die Frage offen bleiben, ob diese Wirkung eine spezifische Eigenschaft eines im Caseinhydrolysat befindlichen Stoffes ist oder von jedem Energiespender des Nährbodens herrühren kann. Auf diese Frage antworten wir im folgenden zum Teil auf Grund unserer eigenen Erfahrungen, zum Teil auf Grund der Literaturdaten.

Ähnlich wie in unserem vorigen Versuch, wurde auch die bakteriostatische Wirksamkeit des Sulfanilamid in verschiedenen Nährböden geprüft. In der Glucose-Salzmischung beträgt der bakteriostatische Titer dieses Präparates mol/8000, in Caseinnährlösung mol/2000, während die in Fleischbrühe geimpften Colibazillen selbst bei der Sulfanilamidverdünnung mol/1000 sich vermehren konnten. Im weiteren wurden 5 ccm des nach Sahyun<sup>320</sup> und seinen Mitarbei-

tern hergestellten synthetischen Nährbodens mit Sulfanilamid 1:10.000 versetzt, dann wurden die in Tabelle 17. verzeichnete Stoffe in je 2 ccm Volumen in die Röhren eingetragen, schliesslich die Röhren mit je 3000 Colibazillen beimpft. Die Resultate waren nach 24 Stunden Züchtung folgende:

Tabelle 17.

*Wachstum der Colibazillen in der Anwesenheit von 1:10.000 Sulfanilamid unter der Einwirkung von verschiedenen Substanzen.*

(Ein am 15. 2. 1941 ausgeführter, nicht mitgeteilter Versuch)

| Bezeichnung der Röhre | hinzugefügter Stoff  | Wachstum |
|-----------------------|--|----------|
| 1.                    | 2 ccm Kochsalzlösung   | —        |
| 2.                    | 2 mg durch Filtrierung sterilisiertes Casein                           | —        |
| 3.                    | 2 mg mit Schwefelsäure hydrolysiertes Casein                           | +++      |
| 4.                    | 10 mg mit Salzsäure hydrolysiertes Gelatin                             | +++      |
| 5.                    | 1 mg " " " "   | +        |
| 6.                    | 2 ccm dialysiertes Pferdeserum   | —        |
| 7.                    | 0,2 ccm mit Schwefelsäure hydrolysiertes Pferdeserum                   | +++      |
| 8.                    | 2 mg Tyrosin, Tryptophan, Leuzin, Cystin, Glycocoll oder Glutaminsäure | —        |
| 9.                    | 10 mg mit $\text{HNO}_2$ oxydiertes Casein-hydrolysat                  | —        |

Der native Eiweissstoffe (Casein *Hammerstein* oder dialysiertes Pferdeserum) hatte keine Interferenz zur Folge, nach seiner Säurehydrolyse machte sich aber eine bedeutende Antisulfanilamidwirkung bemerkbar. Anscheinend rufen nicht alle Aminosäuren des Hydrolysates eine Interferenz hervor, da mehrere hierauf geprüften Aminosäuren für unwirksam befunden wurden. Die Oxydation mit Salpetersäure hebt die Antisulfanilamidwirkung der Hydrolysate interessanterweise auf. Diese Erscheinung spricht dafür, dass der Wirkung doch eine Aminosäure zugrunde liegt.

Da die in der vorigen Tabelle angeführten Eiweisskörper nicht restlos gereinigt werden können, bleibt die Frage, ob die Wirkung durch eine Verunreinigung bedingt sei, dahingestellt. Darum wurden die Versuche mit einem Eiweisskörper wiederholt, der sich besser als das Casein reinigen lassen dürfte, mit zweimal umkristalisiertem und anhaltend dialysiertem Serumalbumin. Die Ergebnisse befinden sich in Tabelle 18.

Der Versuch lässt die Annahme zu, dass der eine Antisulfanilamidwirkung besitzende Stoff aus dem Eiweisskörper selbst herrührt, und nicht aus einer am Eiweisskörper haftenden Verunreinigung. Der Stoff wird erst nach stattgefundener Säurehydrolyse wirksam, von der Alkalihydrolyse wird er vernichtet.

Die im obigen Versuch besprochene Erscheinung kann nach den Beobachtungen von *Bliss* und *Long*,<sup>29</sup> ferner *Harris* und *Kohn*,<sup>141</sup> leicht ausgelegt werden. *Bliss* und *Long* haben nachgewiesen (1941),

Tabelle 18.

*Wachstum der Colibazillen in der Anwesenheit von 1:10.000 Sulfanilamid unter der Einwirkung von Eieralbumin.*

(Ein am 3. 3. 1941, ausgeführter nicht mitgeteilter Versuch)

| Bezeichnung der Röhre | hinzugefügter Stoff                                | Wachstum |
|-----------------------|--|----------|
| 1. . . . .            | 2 ccm phys. NaCl-Lösung                            | —        |
| 2. . . . .            | 400 ccm Eieralbumin                                | —        |
| 3. . . . .            | 40 mg mit Schwefelsäure hydrolysiertes Eieralbumin | +++      |
| 4. . . . .            | 4 mg „ „ „ „                                       | +++      |
| 5. . . . .            | 40 mg mit Natronlauge hydrolysiertes Eieralbumin   | —        |

dass in synthetischem Nährboden die Wirkung von 8,6—12,7 mg % Sulfanilamid auf die Colibazillen von dem *Methionin* in spezifischer Weise behoben wird. Die Wirkung wurde innerhalb der Grenzkonzentrationen 0,015—1000 mg % beobachtet, die niedrigeren und höheren Konzentrationen waren gleicherweise wirkungslos. Homomethionin, Cystein, S-Methylcystein, Homocystein, Cholin, zahlreiche Aminosäuren — ausgenommen das Arginin und Lysin — waren unwirksam. Letztere sollen nach *Long* und *Bliss* eine geringe Antisulfanilamidwirkung haben. *Harris* und *Kohn* brachten noch mehr Beweise für die Antisulfanilamidwirkung des Methionins und wiesen seine Wirksamkeit auf Sulfanilamid, Sulfapyridin und Sulfathiazol nach. *Wurden aber die Sulfanilamide in grossem Überschuss verwendet, so unterblieb die Methionininterferenz, obwohl die p-Aminobenzoessäure auch in diesen Fällen wirksam war.* Die optimale Methioninkonzentration liege bei mol  $10^{-5}$ — $10^{-4}$ . Die Wirkung komme im Proteoseptonnährboden nicht zustande, dies sei aber selbstverständlich, da der Nährboden selber Methionin enthalte. In Verfolgung des Problems haben *Harris* und *Kohn* festgestellt, dass das Pepton nebst p-Aminobenzoessäure und Methionin auch einen dritten wirksamen Bestandteil enthält, doch konnte über die nähere Natur dieses Stoffes nichts ermittelt werden. Die Methioninwirkung erwies sich als weitgehend spezifisch; das *l*(-)-Methionin ist 10—100-mal wirksamer als sein optischer Isomer. Von verschiedenen zahlreichen schwefelhaltigen und schwefelfreien Aminosäuren war nur das Methionin wirksam. Ferner haben *Harris* und *Kohn* festgestellt, dass das Methionin von der Colisuspension nicht oxydiert, decarboxyliert oder desaminiert wird. Die Verfasser sind deshalb der Ansicht, dass diese Aminosäure nicht als ein einfacher Energiespender, sondern als Katalysator wirke, der besonders die Zellteilung fördere.

Der in Tabelle 19. dargestellte Versuch enthält vergleichende Daten in bezug auf die Antisulfanilamidwirkung des Methionins und der p-Aminobenzoessäure.

Schon bisher sprechen mehrere Beobachtungen dafür, dass es ausser der p-Aminobenzoessäure und dem Methionin auch andere



Tabelle 19.

*Antisulfanilamidwirkung von Methionin oder p-Aminobenzoessäure nach Hinzufügung von 5 ccm der Glucose-Ammoniumsalsznährlösung.*

| Konzent. des Sulfanilamid | Wachstum  |                |                               |
|---------------------------|-----------|----------------|-------------------------------|
|                           | Kontrolle | 1 mg Methionin | 1 mg p-Amino-<br>benzoessäure |
| mol/500                   | —         | —              | +++                           |
| mol/1.000                 | —         | —              | +++                           |
| mol/2.000                 | —         | —              | +++                           |
| mol/4.000                 | —         | +              | +++                           |
| mol/8.000                 | —         | +++            | +++                           |
| mol/16.000                | ++        | +++            | +++                           |

Stoffe mit einer Antisulfanilamidwirkung gibt. In Zusammenhang mit den Erfahrungen von *Harris* und *Kohn* wurde schon erwähnt, dass im Pepton ausser den obigen auch das Vorhandensein eines dritten Stoffes mit dieser Wirkung vermutet werden kann. *Tabon*, *Nitti* und *Musset*<sup>289 354 355 356</sup> haben die Antisulfanilamidwirkung der verschiedenen Peptonsorten mit besonderer Sorgfalt analysiert und festgestellt, dass die Antisulfanilamidwirkung des Peptons nicht allein auf seinen p-Aminobenzoessäuregehalt zurückgeführt werden kann, da durch Cellophan die Antisulfanilamidstoffe des Peptons nur zum Teil dialysieren. Demnach dürfte ein Teil der Wirkung an ein grosses Molekül gebunden sein. Wird das Pepton mit Ketengas acetyliert, so nimmt nicht nur die Zahl der Aminogruppen, sondern auch die Antisulfanilamidwirkung ab. Merkwürdigerweise wird die Antisulfanilamidwirkung des Peptons durch 1:3 verdünnte heisse Salzsäure zum grossen Teil vernichtet. Ferner ist es interessant, dass in den einzelnen Peptonarten die Menge der diazotierbaren Bestandteile und die Antisulfanilamidwirkung sich nicht parallel verhalten. *Tabon* und seine Mitarbeiter machten die Beobachtung, dass in einem synthetischen mit *Proteus vulgaris* geimpften Nährboden 5 mg Pepton oder 1 γ p-Aminobenzoessäure die Wirkung von 0,5 mg Sulfanilamid aufheben, beide zusammen gegeben können aber 6—7 mg enthemmen. Hieraus schliessen sie darauf, dass sich im Pepton ein Synergist der p-Aminobenzoessäure befinde. *Tabon* und seine Mitarbeiter fanden aber nicht nur im Pepton, sondern auch in der Hefe einen Stoff mit Antisulfanilamidwirkung, der mit der p-Aminobenzoessäure nicht identisch sei. Bedauerlicherweise war die oben besprochene Wirkung des Methionins *Tabon* und seinen Mitarbeitern unbekannt, es bleibt also dahingestellt, ob ihre Beobachtungen etwa nicht mit dieser Aminosäure zusammenhängen. Auch von dem Charakter der sulfanilamidantagonistisch wirksamen Stoffe, die in dem gereinigten Hefeextrakt von *Loomis*, *Hubbard* und *Neter*<sup>236</sup> neben der p-Aminobenzoessäure gefunden wurden, ist recht wenig bekannt. Dasselbe gilt auch von den Beobachtungen von *Green* und *Biel-schowsky*<sup>128</sup> mit den Auszügen des *Bac. paramelitensis*. Alle diese

Untersuchungen weisen eindeutig darauf hin, dass die Extrakte tierischer und bakterieller Herkunft ausser dem Methicnin und der p-Aminobenzoesäure auch andere Antisulfanilamide enthalten. Diesen scheint aber vom Gesichtspunkte der Sulfanilamidwirkung aus nur eine zweitrangige Bedeutung zuzukommen.

#### 4. Die physiologische Rolle der p-Aminobenzoesäure.

In Kenntnis der p-Aminobenzoesäure-Interferenz wurde die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid von *Fildes*<sup>96</sup> im Jahre 1940 folgenderweise ausgelegt: „p-aminobenzoic acid is an essential metabolite for bacteria, although for technical reason it has not yet been proved to be a growth factor in the absence of a bacterium which can not synthetize it. This essential metabolite is normally associated with an enzyme, and sulphanilamide being structurally similar to it, is capable if in sufficient concentration of displacing p-aminobenzoic acid from its enzyme and stopping its essential line of metabolism.“ Die Hypothese von *Fildes* wurde kurz darauf erhärtet, da Mikroorganismen gefunden wurden, die nur in p-aminobenzoesäurehaltigen Nährböden gedeihen konnten. Demnach verhielt sich der Stoff gegenüber den Bakterien wie ein Vitamin.

Wie erwähnt, war *Woods* nicht imstande, aus dem Hefeextrakt p-Aminobenzoesäure zu isolieren und er vermutete ihr Vorhandensein nur aus ihrer Wirkung. Der endgültige Beweis konnte nur durch die Isolierung erbracht werden. Dies gelang noch 1940 *Rubbo* und *Gillispie*,<sup>318</sup> die aus der Hefe das Benzoylderivat der p-Aminobenzoesäure herstellten. *Blanchard*<sup>22</sup> konnte die Säure aus der Hefe in freiem Zustand isolieren. Er machte die Beobachtung, dass die Verbindung in der Hefe in freier Form und auch in irgend einer gebundenen Form — wahrscheinlich in Peptidbindung — vorkommt.

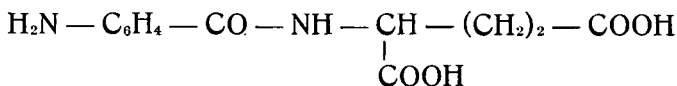
*Kuhn* und seine Mitarbeiter isolierten diese aromatische Aminosäure auf einem anderen Wege, unabhängig von den erwähnten Untersuchungen. Bekanntlich ist die Milch der Kühe, die mit dem sog. „Silofutter“ gefüttert werden, für die Herstellung von Käsesorten harter Konsistenz ungeeignet. Diese seltsame Erscheinung wurde mit einem akzessorischen Stoff in Zusammenhang gebracht und angenommen, dass sich der *Lactobazillus* bei seinem Nichtvorhandensein nicht vermehren könne. *Kuhn, Müller* und *Schwarz*<sup>201, 281</sup> versuchten unter Verwendung eines Milchsäurebakteriums, des *Streptobakterium plantarum*, als Testobject, diesen hypothetischen Stoff, das Vitamin H', zu isolieren. Durch Verarbeitung der Hefekonzentrate konnte das Vitamin H' in Form seines Methylesters isoliert werden. Im Laufe der chemischen Untersuchung hat es sich gezeigt, dass das Vitamin mit der p-Aminobenzoesäure identisch ist.

Ausser dem *Streptobakterium plantarum* ist jetzt auch von anderen Bakterien bekannt, dass sie die p-Aminobenzoesäure nicht zu synthetisieren vermögen, weshalb sie nur bei ihrem Vorhandensein gezüchtet werden können. *Rubbo* und *Gillispie*<sup>319</sup> haben festgestellt, dass das *Clostridium acetobutylicum*, das in der Industrie für die Azeton- und Butylalkoholgärung verwendet wird, die p-Aminobenzoesäure gleichfalls benötigt. Der p-Aminobenzoesäurebedarf dieser Bakterien ist ziemlich gering: für das *Streptobakterium planta-*

rum  $1,6 \times 10^{-10}$  g/ccm, für das Cl. acetobutylicum  $1,5 \times 10^{-10}$  ml reichen schon aus. Ausser diesen können der Lactobacillus arabinosus (*Isbell*<sup>155</sup>), eine Art der Neospora mutans (*Tatum* und *Beadle*<sup>357</sup>), das Acetobakt. suboxydans (*Lampen*,<sup>210</sup> *Landy* und *Dickens*<sup>211</sup> und ihre Mitarbeiter), der Lactobacillus casei und einzelne Stämme der Diphtheria gravis (*Chattaway*<sup>54</sup> und seine Mitarbeiter) die p-Aminobenzoessäure nicht entbehren.

Es dürfte sich erübrigen, auf die sonstigen biologischen Eigenschaften der p-Aminobenzoessäure ausführlich einzugehen. Dieser Stoff, der anscheinend auch von höher geordneten Lebewesen beansprucht wird, wurde von *Ansbacher*<sup>2</sup> in den B<sub>2</sub>-Komplex einge-  
reicht. Seine Rolle ist vorläufig unbekannt, er scheint auch an der Melaninbildung beteiligt zu sein (*Martin*, *Wisansky* und *Ansbacher*<sup>264</sup>). Nach *Lipmann*<sup>221</sup> werde die Oxydation der p-Aminobenzoessäure durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von der Peroxydase katalysiert. Die Oxydation liefert ein unbekanntes Pigment. Die Bildung dieses Pigmentes wird vom Sulfanilamid verhindert. Als Ergänzung sollen noch die Beobachtungen von *Bauer* und *Rüf*<sup>10</sup> erwähnt werden. Sie haben gefunden, dass die Spontanoxydation des p-Hydrochinons, ferner die durch die Kartoffeltyrosinase bedingte Oxydation des Tyrosins von der p-Aminobenzoessäure, der Sulfanilsäure und den Sulfanilamiden gleicherweise gehemmt werden. Diese Beobachtungen sind aber vorläufig für die chemotherapeutische Wirkung des Sulfanilamid belanglos.

Wie erwähnt ist die p-Aminobenzoessäure nach *Blanchard* in der Hefezell<sup>2</sup> zum Teil in gebundenem Zustand vorhanden. Auch andere Beobachtungen sprechen dafür, dass dieser Stoff in den Bakterien und dem Organismus, wenigstens zum Teil, gebunden ist. Aus diesem Grunde erhebt sich die Frage, ob die gebundene p-Aminobenzoessäure nicht wirksamer ist als die freie. *Auhagen*<sup>5</sup> hat gefunden, dass die p-Aminobenzoyl-l(+)-glutaminsäure



als Wuchsstoff 8—10-mal wirksamer ist als die p-Aminobenzoessäure. Diese Wirkung ist für das genannte Peptid kennzeichnend; sein optisches Antipod, das N-p-Aminobenzoylglycin, -glycylglycin, -leucin, sind unwirksam. *Anscheinend ist die p-Aminobenzoyl-l(+)-glutaminsäure der p-Aminobenzoessäure nur als Wuchsstoff überlegen. Ihre Antisulfanilamidwirkung ist unwesentlich (Ivánovics*<sup>165</sup>), z. B. im Falle von Streptokokken 100-mal schwächer als die der p-Aminobenzoessäure.

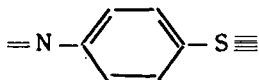
Unter den mit der p-Aminobenzoessäure verwandten Verbindungen zeigt die p-Aminophenylelessigsäure (H<sub>2</sub>N.C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>.CH<sub>2</sub>.COOH) ein ganz besonderes Verhalten. Als Wuchsstoff wirkt sie auf das Cl. acetobutylicum nach *Rubbo* und *Gillispie*<sup>319</sup> ungefähr 10-mal so stark wie die p-Aminobenzoessäure, dagegen besitzt sie keine Antisulfanilamidwirkung. Diese Erscheinung zu erklären ist umso schwerer, als sie, wie im folgenden noch gezeigt wird, mit den gegenwertigen Kenntnissen überhaupt nicht in Einklang gebracht werden kann. Die Ursache dieses eigenartigen Verhaltens lässt sich vorläufig nicht ermitteln. Es hat den Anschein, dass sich die Verbindung mit anderen

Bakterien anders verhält. *Landy* und *Dickens*<sup>211</sup> haben die p-Aminophenyllessigsäure als Wuchsstoff für das *Acetobakt. suboxydans* nur wenig wirksam gefunden.

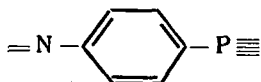
## 5 Nähere Verhältnisse des zwischen Sulfanilamid und p-Aminobenzoesäure bestehenden Antagonismus. Wesen der Sulfanilamidwirkung.

Gemäss der Auffassung von *Fildes* werden die Mikroorganismen bei Vorhandensein gewisser Hemmstoffe bezüglich ihrer Nährstoffansprüche empfindlicher, indem sie im Gefolge ihrer gehinderten Fermenttätigkeit auch solche Stoffe beanspruchen, die sie sonst ohne Schwierigkeiten erzeugen. Nach *Woods* Entdeckung ist das Gesagte auch von der Sulfanilamidwirkung gültig geworden: Sulfanilsäure, Sulfanilamid bzw. ihre Derivate verdrängen die p-Aminobenzoesäure — vermittels ihrer ähnlichen Struktur — aus dem Bakteriumleib und nehmen deren Stelle ein, ohne jedoch ihre Rolle zu übernehmen. Wie auch schon von *Stamp* vermutet wurde, ersetzt die die Interferenz hervorrufende Verbindung nicht das Ferment, sondern nur seine wirksame Gruppe (prothetische Gruppe, Coferment). Dass der sulfanilamidbedingten Hemmung ein Wettbewerb mit der p-Aminobenzoesäure zugrunde liegt, erhellt aus dem Umstand, dass schwefelfreie Verbindungen, sofern sie eine ähnliche Struktur besitzen, wirksam sein können. Für die Auffassung von *Fildes* lassen sich auch die quantitativen Verhältnisse des Antagonismus auswerten. Zwar wird den Beziehungen der chemischen Struktur zur Wirkung ein besonderes Kapitel gewidmet, erfordert das aufgetauchte Problem eine allgemeine Erörterung schon an dieser Stelle.

Früher legte man der chemotherapeutischen Wirkung die Gruppe



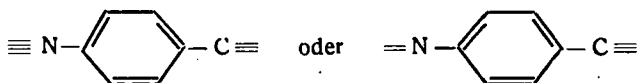
zugrunde. *Bauer* und *Rosenthal*<sup>14</sup> gaben 1939 bekannt, dass die mit Streptokokken infizierte Maus auch mit arsen- oder phosphorhaltigen Benzolderivaten, z. B. mit der 1,4, Nitro-4'-aminodiphenylarsinsäure oder der bis-(4-Dimethylamino-phenylphosphorsäure) erfolgreich behandelt werden kann. Zu dieser Zeit konnte aber noch nicht entschieden werden, ob diese Verbindungen nach einem ähnlichen Mechanismus wie das Sulfanilamid wirken oder eine neuartige chemotherapeutische Wirkung darstellen. Von der Phosphanilsäure wurde im Jahre 1942 festgestellt, dass es die Entwicklung des Streptobakterium plantarum aufhebt und die Wirkung der p-Aminobenzoesäure ausgleicht. Demnach sind auch die Moleküle mit der Gruppe



imstande, die p-Aminobenzoesäure zu verdrängen. Dagegen besitzt das ähnliche Arsenderivat keine Sulfanilamidwirkung.

Ähnlich wie die Sulfanilamide, beeinflussen auch die p-Nitro-

benzoesäure und ihre Ester die durch *Pneumococcus* (*Mayer* und *Oechslin*,<sup>269</sup> *Domagk*,<sup>80</sup> *Barlow*,<sup>6</sup> *Ivánovics*<sup>167</sup>) und *Streptococcus viridans* (*Gruhzit*<sup>135</sup>) bedingte Infektion der Maus in günstigem Sinne. Nach *Domagk* wirke das „Amonal“ ( $\text{O}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_{13}$ ) auf die Pneumokokkeninfektion noch energischer als das Sulfapyridin und das Sulfathiazol. Auch in meinen Versuchen war die p-Nitrobenzoesäure gegen die Infektion der Mäuse mit *Pneumococcus* Typ 7 wirksamer als das Sulfanilamid. Die p-Nitrobenzoesäure ( $\text{NO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$ ) übt im Caseinnährboden auf den *Staphylococcus* eine ausgeprägte bakteriostatische Wirkung aus; die Bakteriostase wird von der p-Aminobenzoesäure aufgehoben (*Ivánovics*<sup>160</sup>). Ähnliche Beobachtungen machte *Hirsch*<sup>149</sup> mit dem p-Aminobenzamid ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$ ). Demnach können die Verbindungen mit der Gruppe



gleichfalls sulfanilamidähnlich wirken. In bezug auf die Wirkung der Verbindungen dieser Art sind die Untersuchungen von *Kuhn*<sup>205, 207</sup> und seinen Mitarbeitern besonders aufschlussreich. Sie, ferner *Auhagen*,<sup>5</sup> haben festgestellt, dass von dem 4,4'-Diaminodiphenylsulfon ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ) ähnlichen schwefelfreien Verbindungen, die p-Aminophenylketone eine Sulfanilamidwirkung besitzen. Dasselbe gilt von dem 4-Nitroacetophenon ( $\text{O}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ ) und von dem 4-Aminoacetophenon ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ ). Ferner fanden *Kuhn*<sup>205</sup> und seine Mitarbeiter, dass das 4,4'-Diaminodibenzil ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{CO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ) im Reagenzglasversuch gegen das Streptobakterium *plantarum* 4—6-mal stärker wirkt als das Sulfanilamid. Die p-Aminobenzoesäure hebt auch die Wirkung dieser Verbindung auf. Die Grundbedingung der sulfanilamidartigen bakteriostatischen Wirkung ist eine der der p-Aminobenzoesäure ähnliche Molekularstruktur. Dementsprechend ist z. B. das 4,4'-Diaminostilben ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CH}:\text{CH} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ) unwirksam.

Das Gesagte wird in Tabelle 20. schematisch in übersichtlicher Weise zusammengefasst.

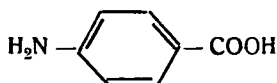
Interessanterweise *wirkt in einer hohen Konzentration auch die p-Aminobenzoesäure hemmend auf das Bakterienwachstum*. *Hirsch*<sup>148</sup> beobachtete, dass der Sauerstoffverbrauch einer gedeihenden *Staphylococcus*kultur von p-Aminobenzoesäure in grosser Konzentration ebenso herabgesetzt wurde wie vom Sulfanilamid. Diese Wirkung erwies sich als spezifisch; unter ähnlichen Umständen waren die ortho- und meta-Isomere unwirksam. *Auhagen*<sup>5</sup> gab eine interessante Erklärung für diese Erscheinung. Die im Überschuss vorhandene p-Aminobenzoesäure hindere darum das Zellwachstum, weil die Rolle des Cofermentes nicht von der Säure, sondern von einem peptidartigen Derivat der Säure gespielt werde. Infolge der strukturellen Ähnlichkeit wird das Coferment von dem Rezeptor, dem Apoferment, durch die überschüssige p-Aminobenzoesäure verdrängt, wodurch die Plasmasynthese zu einem Stillstand komme.

Wir geben zu, dass die p-Nitrobenzoesäure sehr ähnlich wirkt wie das Sulfanilamid, dennoch stimmen ihre Wirkungen nicht in jeder Hinsicht überein. Hierfür spricht z. B. die Erfahrung, dass die

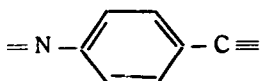
Tabelle 20.

*Struktur der p-Aminobenzoesäure und Gerüste der bisher bekannten Verbindungen mit einer Sulfanilamidwirkung mit Beispielen.*

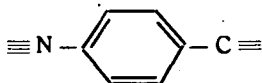
*Wuchsstoff (p-Aminobenzoesäure)*



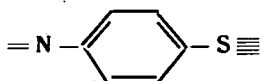
*Molekül-Gerüste mit einer Sulfanilamidwirkung.*



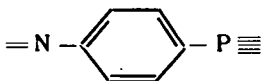
- z. B. 4-Aminobenzamid ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$ ): ++  
 4-Aminobenzoyl-2-amidopyridin ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{C}_5\text{NH}_5$ ): +  
 4-Aminoacetophenon ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ ): +  
 4,4'-Diaminobenzophenon ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ): ++  
 4,4'-Diaminobenzil ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{CO} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ): ++++



- z. B. 4-Nitrobenzoesäure und ihre Ester ( $\text{O}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COOH}$ ): +++  
 4-Nitroacetophenon ( $\text{O}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ ): ++



- z. B. Sulfanilsäure ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_3\text{H}$ ): +  
 Sulfanilamid ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2\text{NH}_2$ ): +++  
 4,4'-Diaminodiphenylsulfon ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH}_2$ ): ++++



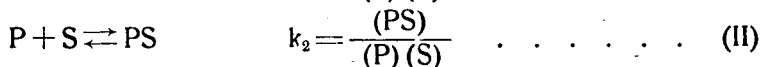
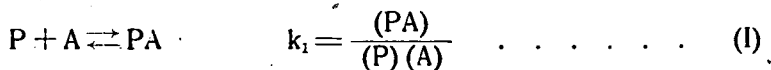
- z. B. Phosphanilsäure ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{PO}_3\text{H}$ ): +

Bemerkung: die Zahl der Kreuze ist ein Masstab der bakteriostatischen Wirksamkeit.

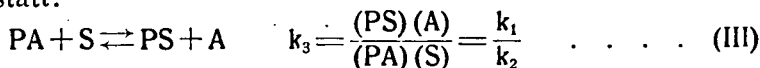
bakteriostatische Wirkung der p-Nitrobenzoesäure auf Colibazillen im Glucose-Ammoniumsals-Nährboden von der p-Aminobenzoesäure nicht aufgehoben wird. Ein weiterer Unterschied besteht darin, dass ihre auf Staphylokokken ausgeübte bakteriostatische Wirkung (im Caseinnährboden) nicht nur von der p-Aminobenzoesäure, sondern bis zu einem gewissen Grade auch von der Pantothenensäure (*Ivánovics*<sup>160</sup>) gehemmt wird. Eigentümlicherweise wird von dieser Verbindung das Wachstum der Streptokokken selbst unter idealen Versuchsbedingungen (Caseinnährboden) nicht verhindert.<sup>165</sup> Diese Beobachtungen sprechen ausnahmslos dafür, dass ihr Wirkungsmechanismus von dem der Sulfanilamide abweicht.

Nach der erwähnten Auffassung von *Woods, Fildes, Kuhn* und seinen Mitarbeitern, werde die an dem entsprechenden Rezeptor

gebundene p-Aminobenzoesäure von dem Sulfanilamid in reversibler Weise verdrängt; sonach können beide Stoffe mit dem Rezeptor dissoziationsfähige Synplexe bilden. *Jensen* und *Schmith*<sup>178</sup> betrachten — ähnlich der Auffassung anderer Forscher — die p-Aminobenzoesäure (A) als ein Coenzym, das mit dem eiweissartigen Apoenzym (P) ähnlich wie das Sulfanilamid (S) in eine reversible Verbindung tritt. Auf Grund des Massenwirkungsgesetzes lassen sich diese Prozesse mit folgenden Formeln ausdrücken:



Kommen die einen PA-Synplex enthaltenden, also funktionsfähigen Zellen mit dem Sulfanilamid in Berührung, so findet folgende Reaktion statt:



*Demnach ist die bakteriostatische Wirkung umso stärker, je grösser der Wert von  $k_2$  ist, d. i. in einem umso grösseren Ausmass wird die p-Aminobenzoesäure verdrängt.*

Der Wettbewerb zwischen Sulfanilamid und p-Aminobenzoesäure um den Rezeptor wurde von *Kuhn*<sup>200</sup> in geistvoller Weise mit der Affinität des CO und O<sub>2</sub> zum Hämoglobin verglichen. CO besitzt eine Affinität zum Hämoglobin, die die Affinität des O<sub>2</sub> 200-fach übertrifft, mithin werden sich Oxy- und Kohlenoxydhämoglobin im Falle eines gleichen Partialdruckes zu einander wie 1:200 verhalten. Die Affinität der p-Aminobenzoesäure zum Rezeptor ist grösser als die des Sulfanilamid. Das Verhältnis ihrer Affinitäten erhält man zahlenmässig, wenn man bestimmt, wieviel Moleküle des Chemotherapeutikums die Antagonistenwirkung von 1 mol p-Aminobenzoesäure beheben, richtiger, wenn man das Mengenverhältnis ermittelt, bei dem die Hälfte der maximalen Bakterientwicklung vor sich geht.

Die ersten einschlägigen Versuche (z. B. *Woods*,<sup>203</sup> *Landy* und *Wyano*<sup>212</sup>) wurden in Fleischbrühe oder Peptonwasser, also in Nährböden, die mit p-Aminobenzoesäure verunreinigt sind, ausgeführt, weshalb sie für dieses Problem von fraglichem Wert sind. Sicher wurden die Ergebnisse dadurch beeinflusst, dass der Nährboden ausser der zugesetzten p-Aminobenzoesäure diese Verbindung auch in Form von Verunreinigung enthielt. Das Verhältnis der Affinitäten kann genau nur für die Bakterien bestimmt werden, die p-Aminobenzoesäure nicht erzeugen, wie z. B. das Streptobakt. plantarum, Cl. acetobutylicum. *Möller* und *Schwarz*<sup>281</sup> haben im Falle des Streptobakt. plantarum gefunden, dass die Wirkung von 1 mol p-Aminobenzoesäure von rund 5000 mol Sulfanilsäure aufgehoben wird. *Kuhn*<sup>207</sup> und seine Mitarbeiter sind der Meinung, dass diese Verhältniszahl für die verschiedenen Sulfanilamiderivate entsprechend ihrer bakteriostatischen Wirksamkeit sehr verschieden sein kann. So sind z. B. von dem p-Aminobenzoyl-aminopyridin 48.000, von dem Sulfanilamid 150, vom 4,4'-Diaminodiphenylsulfon nur 28 Moleküle nötig, um die Antisulfanilamidwirkung von 1 mol p-Aminobenzoesäure aufzuheben.

Demnach besitzt die letztgenannte Verbindung eine  $\frac{48.000}{28} = 1.720$ -mal

grössere Affinität zum Rezeptor als die zuerst erwähnte. Die Affinität wird nicht nur von der Verbindung bestimmt, sondern sie hängt auch vom Rezeptor ab. Demnach kann das Verhältnis Sulfanilamid : p-Aminobenzoesäure für das nämliche Präparat entsprechend der Bakteriumart bzw. dem Stamm verschiedene Werte aufnehmen. So ist z. B. die Affinität des Sulfanilamid zum Rezeptor des Cl. acetobut. auffallend gering; nach *Rubbo* und *Gillispie*<sup>319</sup> enthemmt 1 mol p-Aminobenzoesäure im Falle dieses Bakteriums 26.000 mol Sulfanilamid. Auf die Rolle des Rezeptors kommen wir in Zusammenhang mit der Sulfanilamidresistenz noch ausführlich zurück.

Die vom Gesichtspunkt der praktischen Chemotherapie wichtigen Mikroorganismen können ihren p-Aminobenzoesäurebedarf beinahe ausnahmslos selbst herstellen. Darum können die Verhältnisse des Antagonismus zwischen Sulfanilamid und p-Aminobenzoesäure bei diesen Bakterien nicht so genau und mengenmässig erforscht werden wie bei den Bakterien, die diese Säure nicht erzeugen. Wir glauben

Tabelle 21.

*Antisulfanilamidwirkung der p-Aminobenzoesäure in Staphylococcus-kulturen.*

| Mittel               | Bakteriostatischer Titer* | Untersuchung des Antagonismus |     |
|----------------------|---------------------------|-------------------------------|-----|
|                      |                           | Konzent. des Mittels**        | Qu  |
| Sulfapyridinsulfamid | mol/11.300                | mol/500                       | 760 |
| Sulfanilamid         | mol/21.400                | mol/1.250                     | 950 |
|                      |                           | mol/1.000                     | 620 |
|                      |                           | mol/500                       | 540 |
|                      |                           | mol/200                       | 540 |
| Sulfathiazolin       | mol/44.500                | mol/10.000                    | 155 |
|                      |                           | mol/5.000                     | 180 |
| Sulfapyridin         | mol/47.000                | mol/5.000                     | 58  |
|                      |                           | mol/1.000                     | 40  |
|                      |                           | mol/500                       | 44  |
| Uliron               | mol/44.500                | mol/10.000                    | 35  |
|                      |                           | mol/5.000                     | 33  |
| Sulfamethylthiazol   | mol/323.000               | mol/25.000                    | 18  |
|                      |                           | mol/2.250                     | 18  |
|                      |                           | mol/1.000                     | 14  |
|                      |                           | mol/500                       | 10  |
| Sulfaphenylthiazol   | mol/4.500                 | mol/10.000                    | 15  |

\* die grösste Verdünnung des Mittels, die im 20stündigen Versuch 66% des maximalen Wachstums verhinderte.

\*\* die Antisulfanilamidwirkung untersucht bei der angegebenen Konzentration.



jedoch, dass die von diesen Bakterien erzeugte Menge von p-Aminobenzoessäure vernachlässigt werden kann, insbesondere wenn der Antagonismus bei Vorhandensein grosser Sulfanilamidüberschüsse studiert wird. Mit Rücksicht darauf untersuchten wir diese Probleme bei verschiedenen pathogenen Bakterien mit einer Anzahl von Sulfanilamiddérivaten. Selbstredend war der verwendete Nährboden p-Aminobenzoessäurefrei. Die Untersuchungen wurden mit der im Kapitel III. besprochenen Technik durchgeführt: der Nährboden wurde mit einem Vielfachen der zur bakteriostatischen Wirkung erforderlichen Sulfanilamidmenge versetzt, die p-Aminobenzoessäure in wechselnder Menge in die Röhren eingetragen, die Röhren wurden beimpft, die Entwicklung der Bakterien quantitativ ermittelt. Tabelle 21. stellt die Ergebnisse eines Staphylokokkenversuches dar. *Qu* bedeutet die Zahl der Sulfanilamidmoleküle, die bei Vorhandensein von 1 mol p-Aminobenzoessäure das Bakteriumwachstum auf 33% des maximalen Wertes zurückdrängen.

Wie ersichtlich, wird von der p-Aminobenzoessäure im Falle eines geringeren Chemotherapeuticumüberschusses die Wirkung einer grösseren Anzahl der Chemotherapeuticummoleküle aufgehoben als bei Vorhandensein grosser überschüssiger Mengen. Der Grund dieser Erscheinung liegt darin, dass die von den Bakterien erzeugte p-Aminobenzoessäure im Falle eines geringeren Chemotherapeuticumüberschusses besser zur Geltung kommt als bei Vorhandensein grosser Überschüsse. Ferner lässt sich aus der Tabelle feststellen, dass der Wert von *Qu*, entsprechend der Theorie, sich umgekehrt wie

Tabelle 22.

*Die bakteriostatische Wirkung von verschiedenen Sulfanilamiddérivaten und die Antisulfanilamidwirkung der p-Aminobenzoessäure bei verschiedenen Bakterien.*

| Das Mittel          | Bact. coli <sup>b</sup>     | Streptbact. plantarum <sup>c</sup> | Bac. Sonne <sup>d</sup>  | Bac. Shiga <sup>d</sup> | Bac. Flexner <sup>d</sup> |
|---------------------|-----------------------------|------------------------------------|--------------------------|-------------------------|---------------------------|
|                     | Baktstw. Qu                 | Qu                                 | Baktstw. Qu              | Baktstw. Qu             | Baktstw. Qu               |
| Sulfanilamid        | 400 5.000                   | 150                                | 500 2.500                | 500 2.500               | 500 1.650                 |
| S. guanidin         | 2.000 1.000                 |                                    | 1.000 1.250              | 1.000 1.250             | 1.000 830                 |
| S. pyridin          | 50.000 40                   | 65                                 | 3.000 21                 | 10.000 125              | 10.000 50                 |
| S. thiazol          | 200.000 8                   | 35                                 |                          |                         |                           |
| S. methylthiazol    |                             |                                    | 20.000 12                | 3.000 41                | 40.000 21                 |
| Sulfon <sup>a</sup> |                             | 28                                 |                          |                         |                           |
| Verfasser           | Rose und Fox <sup>311</sup> | Kuhn <sup>207</sup> und Mitarb.    | Ivánovics <sup>166</sup> |                         |                           |

Erklärung: Baktstw. = bakteriostatische Wirkung: z. B. 400 = mol/400.

Qu = 1 mol p-Aminobenzoessäure hebt die Wirkung von Sulfanilamidmolekülen der angegebenen Zahl auf.

a) 4,4'-Diaminodiphenylsulfon

b) in Glucose-Ammonsalzlösung untersucht

c) in einem Aminosäurenmischung-Nährboden. Die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamiddérivate war von der Menge der hinzugegebenen p-Aminobenzoessäure abhängig

d) in Casein-Nährboden untersucht.

die bakteriostatische Wirksamkeit verhält. Dieser Zusammenhang wurde auch in den Versuchen mit anderen Krankheitserregern gefunden (s. Tab. 22.).

Mit dem vom Gesichtspunkt der praktischen Chemotherapie wichtigsten Erreger, dem Streptococcus, wurden zahlreiche Versuche angestellt; ihre Ergebnisse sind in Tabelle 23. zusammengefasst.

Tabelle 23.

Die bakteriostatische Wirkung von verschiedenen Sulfanilamidderivaten auf *Streptococcus haemolyticus* (Gruppe B).

| V e r b i n d u n g                            | Baktst. Titer     | Interferenz        |              |
|--|-------------------|--------------------|--------------|
|  |                   | Zahl der Einheiten | Qu           |
| 4-Aminobenzosulfo-4'-nitroanilid               | mol/332.000       | 22                 | 200          |
| 2-Sulfanilamido-4-methylthiazol                | mol/290.000       | 29                 | 300          |
| 2-Sulfanilamido-4-phenyl-5-methylthiazol       | mol/280.000       | 28                 | 187          |
| 2-Sulfanilamido-5-sulfamidopyridin             | mol/145.000       | 24                 | 350          |
| 4,4'-Diaminodiphenylsulfon                     | mol/145.000       | 14                 | 249          |
| 2-Sulfanilamido-4-methylpyrimidin              | mol/97.000        | 32                 | 770          |
| 2-Sulfanilamidopyridin                         | mol/82.000        | 8                  | 750          |
| 2-Sulfanilamidothiazolin                       | mol/65.000        | 13                 | 800          |
| 4-Aminobenzosulfoacetamid                      | mol/64.000        | 65                 | 800          |
| 4-Aminobenzosulfo-4'-aminoanilid               | mol/58.000        | 29                 | 849          |
| 4-Aminobenzosulfo-2'-carboxyanilid             | mol/47.000        |                    |              |
| 4-Aminobenzosulfo-4'-dimethylsulfoanilid       | mol/47.000        | 10                 | 670*         |
| 4-Aminobenzosulfo-2'-hydroxyanilid             | mol/46.000        | 23                 | 500*         |
| 4-Aminobenzosulfo-anilid                       | mol/45.000        | 11                 | 822          |
| 4-Aminobenzosulfo-2'-chloranilid               | mol/42.000        | 10                 | 622*         |
| 4-Aminobenzosulfo-2'-methylanilid              | mol/28.000        | 28                 | 600*         |
| 4-Aminobenzosulfo-4'-hydroxyanilid             | mol/28.000        | 14                 | 1.000*       |
| <b>4-Aminobenzosulfonamid</b>                  | <b>mol/22.000</b> | <b>22</b>          | <b>3.250</b> |
| 4-Aminobenzosulfo-3'-carboxyanilid             | mol/18.000        | 18                 | 1.665*       |
| Sulfaguanidin                                  | mol/13.000        | 13                 | 2.500*       |
| Methylensulfoxysäures Sulfanilamid-Natrium     | mol/7.200         | 7                  | 9.990        |
| 4-Aminobenzosulfo-4'-carboxyanilid             | mol/6.200         |                    |              |
| Sulfanilsäure                                  | mol/3.900         | 8                  | 7.000        |
| 4-Aminobenzosulfo-4'-oxy-5'-carboxyanilid      | mol/3.300         |                    |              |
| 4-Aminobenzosulfoaminoessigsäure               | mol/1.430         | 7                  | 11.000       |
| 4-Aminobenzosulfo- $\beta$ -aminopropionsäure  | mol/1.400         |                    |              |
| 4-Aminobenzosulfoamino-äthansulfosäure         | mol/1.100         |                    |              |
| Marfanil                                       | mol/1.000         | 2                  | 0            |
| 4,4'-Dioxydiphenylsulfon                       | mol/1.000         | 2                  | 0            |
| 4-Aminobenzosulfo- $\alpha$ -aminopropionsäure | mol/1.000         |                    |              |
| Succinylsulfapyridin                           | mol/1.000         | 1,5                | 0            |
| 4,4'-Diacetylaminodiphenylsulfon               | > mol/5.000       |                    |              |
| Disulfanilimid                                 | > mol/2.500       |                    |              |
| Prontosil solubile                             | > mol/500         |                    |              |
| Acetylsulfanilamid                             | > mol/500         |                    |              |
| Succinylsulfanilamid                           | > mol/500         |                    |              |

Die in dieser Tabelle enthaltenen Ergebnisse lassen den besprochenen Zusammenhang mit einer geringeren Regelmässigkeit erscheinen, da hier der Wert *Qu* nicht immer der umgekehrten Reihe der bakteriostatischen Wirkung entspricht. Wir glauben dieser Erscheinung vor allem technische Momente zugrunde legen zu dürfen: die Abweichung ist einmal durch Versuchsfehler bedingt, zum anderen durch den Umstand, dass die verwendeten Präparate nicht immer mit dem gleichen Überschuss hinzugefügt werden konnten, da sie sich in Wasser zum Teil schwer lösen. Bei der Bestimmung der mit einem \* bezeichneten Werte begegneten uns besonders grosse Schwierigkeiten. Um in diesen Fällen eine entsprechende Konzentration des Chemotherapeuticums erreichen zu können, musste das Präparat zunächst in einer mol/10—mol/20 Konzentration in Alkohol gelöst und die Kultur mit der entsprechenden Menge der alkoholischen Lösung versetzt werden. Obwohl die Vermehrung der Bakterien von dieser Alkoholmenge kaum beeinträchtigt werden dürfte, kann diese Methode doch nicht als einwandfrei angesehen werden, denn gerade die auf diese Weise erhaltenen Werte können in die Reihe schwer eingefügt werden. Die leichtlöslichen aber wenig wirksamen Präparate können gleichfalls zu Fehlerquellen Anlass geben: der notwendige Überschuss konnte bei diesen nur im Falle hoher Konzentrationen erreicht werden, wo schon nichtspezifischen antibiotischen Wirkungen (z. B. der Wirkung der Hypertonie) Rechnung zu tragen ist. Werden diese Schwierigkeiten und die sich hieraus ergebenden Fehler berücksichtigt und in Abzug gebracht, so kann festgestellt werden, dass der Zusammenhang zwischen dem *Qu*-Wert, der die Affinität der einzelnen Präparate ausdrückt, und der bakteriostatischen Wirksamkeit im grossen und ganzen auch in diesen Versuchen bestätigt werden konnte.

Dennoch lassen sich in Verbindung mit den Versuchsdaten einige Anomalien beobachten, denen nicht die erwähnten technischen Momente zugrunde liegen. In Tabelle 21. befinden sich für die bakteriostatische Wirkung des Sulfathiazolin und des Sulfapyridin ungefähr gleiche Werte, die entsprechenden *Qu*-Werte weichen aber voneinander wesentlich ab. Ähnliche auffallende Regelwidrigkeiten wurden auch in anderen Versuchen beobachtet (s. Tabelle 23.). Aus diesen möchte ich darauf schliessen, dass die antibiotischen Eigenschaften der Sulfanilamide nicht nur gemäss der Reaktion  $S + P \rightleftharpoons SP$ , sondern auch auf anderen Wegen zur Geltung kommen. Hier sind zunächst die verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften der Präparate — Lipoidlöslichkeit, Penetrierungsfähigkeit in das Elektropasma — zu berücksichtigen, ferner der Umstand, dass die Sulfanilamidderivate auf die Bakterien nicht nur spezifisch auf dem Wege über das p-Aminobenzoessäure-Ferment einwirken, sondern, besonders in höheren Konzentrationen, auch andere lebenswichtige Zentren der Zelle schädigen können. Letztere Wirkung dürfte kaum spezifisch und entsprechend der eigenartigen Molekularstruktur der einzelnen Präparate von verschiedener Intensität sein. Die Möglichkeit einer solchen nichtspezifischen antibiotischen Wirkung ist um so mehr in Erwägung zu ziehen, als es mir anlässlich der Untersuchung der bakteriostatischen Salicylatwirkung gelang, ausser einer spezifischen für das Salicylation typischen Wirkung auch die Existenz einer nichtspezifischen Wirkung zu beweisen. Ähnlich kann es sich auch mit den Sulfanilamiden verhalten. Sie besitzen eine spezifischen und eine unspezifisch-antibiotische Wirkung. Wahrscheinlich kommt die letztere, ähnlich wie jede unspezifische Wirkung, bei höheren Konzentrationen stärker zur Geltung. Dieser Umstand liefert eine Erklärung dafür, dass der Zusammenhang zwischen dem bakteriostatischen und dem *Qu*-Wert nicht für jedes Präparat mit der gleichen Regelmässigkeit gefunden wurde. Die Sulfanilamidderivate wurden nämlich in diesen Versuchen zur Bestimmung der *Qu*-werte in grossem Überschuss, in Form von verhältnismässig konzentrierten Lösungen verwendet, weshalb die unspezifische Wirkung stärker her-

vortreten konnte, als bei der Bestimmung des bakteriostatischen Titers. Mit anderen Worten: unter zwei verschiedenen Versuchsbedingungen wurden die Bakterien von Schädigungen getroffen, die gewissermassen auch in qualitativer Hinsicht verschieden sind, so ist es nicht überraschend, dass die besprochenen Unregelmässigkeiten auftraten.

Auf Grund der Ausführungen dieses Kapitels kann die Art der direkten Sulfanilamidwirkung heute schon als geklärt angesehen werden. Ein für die ungestörte Zellfunktion erstwichtiger Rezeptor — wahrscheinlich das Apoferment eines bisher nicht näher bekannten Fermentes — kann seiner Aufgabe nur in Form eines mit der p-Aminobenzoesäure gebildeten Synplexes gerecht werden. Diese Stelle der p-Aminobenzoesäure kann von zahlreichen Verbindungen ähnlicher Struktur übernommen werden, ohne aber ihre Rolle zu übernehmen. *Dieser Fall bedeutet noch nicht den Untergang der Zelle, nur das Aufhören des Plasmasynthese. Wie bereits erwähnt wurde, schädigen Sulfanilamide in starker Konzentration möglicherweise auch andere Bakterienzentren darunter vielleicht auch solche, die für den Katabolismus wichtig sein können.* Hierauf weisen wenigstens die Beobachtungen hin, die über eine geringfügige Atmungshemmung beim ruhenden Bakteriumleib berichten. Wir möchten dieser unspezifischen Wirkung vom Gesichtspunkt der praktischen Chemotherapie keinerlei Bedeutung beimessen, da die Konzentration der Chemotherapeutica im Organismus zu niedrig ist, um eine unspezifische Wirkung entfalten zu können.

Bei der Besprechung der Interferenzerscheinungen wurde gezeigt, dass die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide unter gewissen Versuchsbedingungen *zum Teil* auch von anderen Stoffen vernichtet wird. Von dem Methionin und den im Pepton befindlichen, näher nicht bekannten Stoffen, die zu Interferenzerscheinungen Anlass geben können, denken *Harris* und *Kohn*<sup>141</sup> wie folgt: In der Kette des Bakteriumstoffwechsels befinden sich zahlreiche Glieder, die nur in sekundärer Weise sulfanilamidempfindlich seien, indem diese Systeme von dem p-Aminobenzoesäure-Ferment abhängen. Das Sulfanilamid wirke in primärer Weise nur auf das p-Aminobenzoesäure-Ferment ein, wodurch auch die anderen von ihr abhängenden Systeme, nach Erschöpfung ihrer Reserven, funktionsunfähig werden, wodurch die Plasmasynthese, also die Reproduktion, zu einem Stillstand komme. Diese sekundären Systeme seien gegenüber dem Ausfall des p-Aminobenzoesäure-Fermentes nicht gleichweise empfindlich; einzelne werden nur bei hohen Sulfanilamidkonzentrationen lahmgelegt oder sie stellen ihre Funktionen kraft ihrer grösseren Reserven später ein. Hierdurch wäre es erklärlich, dass in synthetischen Nährböden die mit Sulfanilamid nur milde vergiftete Kultur durch Methionin wieder zur Entwicklung veranlasst werden kann, da die anderen sekundären Systeme nur wenig geschädigt worden sind.

Die Annahme, dass das Sulfanilamid nur ein Zwischenglied der Plasmasynthese in primärer Weise schädige, scheint auch deshalb sinngemäss zu sein, da die Tatsache, dass die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide erst nach einer Latenzzeit eintritt, anders nicht ausgelegt werden kann. *Woods*<sup>393</sup> führt zur Erklärung der Latenz an, dass das Inoculum eine Menge von p-Aminobenzoesäure

enthalte, die für mehrere Teilungen ausreiche; solange diese nicht erschöpft sei, höre die Entwicklung nicht auf. Diese Erklärung kann aber mit den gegenwärtigen Kenntnissen über die Sulfanilamidwirkung nicht in Einklang gebracht werden. Bekanntlich kommt die Wirkung des Sulfanilamid in der Weise zustande, dass es die p-Aminobenzoesäure von dem entsprechenden Rezeptor verdrängt; dieser Process müsste aber, ähnlich wie jede Adsorption, sofort oder kurz nach der Begegnung mit dem Präparat erfolgen. Der Einwand, dass die Sulfanilamide sich am entsprechenden Rezeptor nur nach einer längeren Zeit ansammeln können, lässt sich schon auf Grund der bisherigen Ergebnisse ausschliessen. *Schmith*<sup>328</sup> beobachtete, dass die Kulturen, in denen nach Hinzufügung des Sulfanilamid die Vermehrung der Bakterien durch längere Aufbewahrung im Eisschrank verhindert wurde, sich nachher bei 37° ebenso verhielten, wie jene, die unmittelbar in den Brutschrank gelegt wurden: *die Bakteriostase trat in beiden Fällen nach einer Latenz ein*. Um diese Erscheinung zu begreifen, ist anzunehmen, dass das p-Aminobenzoesäure-System in der Kette der an der Plasmasynthese beteiligten Glieder an erster Stelle steht. In diesem Fall können die weiteren Systeme mit Hilfe ihrer Reserven die Plasmasynthese noch eine gewisse Zeit lang auch dann aufrecht erhalten, wenn die Tätigkeit der p-Aminobenzoesäure schon aufgehört hat.

Zweifelsohne kann zu therapeutischen Zwecken nur eine Konzentration der Sulfanilamide verwendet werden, die ausschliesslich *bakteriostatisch* wirkt. Selbstredend gehen die Bakterien selbst unter diesen Bedingungen nach einer verschiedenen langen Zeit zugrunde, es kommt zu einer Erscheinung der Bakterizidie. Dieser Bakteriumuntergang ist unbedingt als eine Folge der Bakteriostase aufzufassen. Einige Erklären diese sekundäre Bakterizidie mit der Annahme, dass die der Sulfanilamidwirkung unterstehenden Bakterien durch „Inanition“ vernichtet werden. Diese Erklärung dürfte kaum zu Recht bestehen, da der Stoffwechsel der Bakteriumzelle vom Gesichtspunkte ihres individuellen Lebens ungestört ist. Wie gezeigt wurde, wird die Atmung der gewaschenen Bakteriumsuspensionen von Sulfanilamiden von geringer Konzentration nicht beeinträchtigt. Das Wesen der Störung liegt in der Regeneration des Bakteriumplasmas, wodurch seine Anfrischung und „Verjüngung“ durch Teilung unmöglich wird. Dies hat das Altern der Zelle zur Folge, weshalb sie früher oder später, entsprechend der Bakteriumart, zugrunde geht. In dieser Beziehung möchten wir noch einmal auf die weiter oben besprochenen elektronmikroskopischen Studien hinweisen, wo die Verfasser (*Vonkennel*<sup>370</sup> und seine Mitarbeiter) an Gonokokken unter Sulfanilamidwirkung dieselben Veränderungen beobachteten, wie an den Zellen alter Kulturen.

Zur Ergänzung sei noch ein Versuch mit dem *Proteus vulg.* beschrieben, da hier eine Analogie zur Veranschaulichung der Sulfanilamidwirkung verwendet werden kann. Bekanntlich ist der *Bac. proteus vulg.*, abgesehen davon, dass er nur in der Anwesenheit von Nikotinsäure oder ihres Amids gedeiht (*Fildes*<sup>34</sup>), hinsichtlich Nährstoffe ein wenig anspruchsvoller Mikroorganismus. In einer Milchsäure-Ammoniumsalzmischung wächst er ganz lebhaft, wenn der Nährboden pro ccm mindestens 0,01 γ Nikotinsäureamid enthält. Das

Bakterium kann kraft seines wohlentwickelten Enzymsystems den Erfordernissen der Plasmasynthese in jeder Beziehung gerecht werden, wenn ihm die nötige Menge Nikotinsäure zur Verfügung steht. *Ohne Nikotinsäure ist aber die Plasmasynthese unmöglich; das Bakterium befindet sich im Falle des Nikotinsäuremangels in einer ähnlichen Lage, wie im Falle einer Vergiftung mit Sulfanilamid, da hier gleichfalls ein unentbehrlicher akzessorische Stoff, die p-Aminobenzoessäure bzw. dessen Funktion fehlt.* Dies geht aus nachstehendem Versuch hervor.

Aus der 24stündigen Agarkultur eines Proteus-Stammes wurde eine stark verdünnte Suspension hergestellt und 10 ccm des nach den Vorschriften von Fildes<sup>94</sup> zusammengesetzten Nährbodens mit der Suspension beimpft. Der Nährboden dient zugleich auch der Verdünnung des Inoculums. Der Nährboden besteht aus 4,5 g Kaliumhydrophosphat, je 0,5 g Ammoniumsulfat und Ammoniumchlorid, 2,5 g Milchsäure, 40 mg Magnesiumsulfat, 5 mg Ferriammoniumzitrat in 1 Lit. dest. Wasser. Das pH des Nährbodens liegt bei 7,6. 10 ccm dieses Nährbodens werden mit verschiedenen Mengen von Nikotinsäureamid versetzt und nach Beimpfung sofort und nach verschiedenen Zeitabständen eine gewisse Menge mit geschmolzenem Agar vermischt und zu Platten gegossen. Um die Schwärmung des Bac. proteus zu verhindern, wurde die Oberfläche der Platte mit 0,3 ccm Alkohol begossen, der Überschuss verschüttet und die Platte in der herkömmlichen Weise mild getrocknet. Die Zahl der entwickelten Kolonien wurde nach 48 Stunden festgestellt.

Tabelle 24.

*Wachstum des B. proteus vulgaris in verschiedene Nikotinsäuremengen enthaltenden Nährböden.*

| Züchtungsdauer | Die menge des Nikotinsäureamids pro 10 ccm Nährboden |              |               |      |
|----------------|--|--------------|---------------|------|
|                | 1 $\gamma$   | 0,1 $\gamma$ | 0,01 $\gamma$ | 0,00 |
| 0 St.          | 150  | 132          | 162           | 115  |
| 2 St.          | 252  | 205          | 242           | 199  |
| 4 St.          | 488  | 433          | 252           | 93   |
| 8 St.          | 572  | 495          | 120           | 67   |
| 24 St.         | 1.380  | 876          | 58            | 20   |
| 48 St.         | ++   | +            | 3             | 0    |
| 72 St.         | +++  | ++           | 0             | 0    |

Erklärung: Die Zahlen bedeuten die Zahl der in 1 ccm Kultur enthaltenden Keime. Die Kreuze geben den Grad der mit dem unbewaffneten Auge sichtbaren Entwicklung an. 0 = in 1 ccm Kultur kein lebendes Bakterium.

Aus dem in der Tabelle aufgestellten Versuch lässt sich folgendes ablesen: Die Keimzählung zeigt schon nach 2 Stunden die Vermehrung der Bakterien; zu diesem Zeitpunkt war diese Vermehrung in allen Röhrchen die gleiche. In den Röhrchen, die 0,01  $\gamma$  oder kein Nikotinsäureamid enthielten, nimmt die Intensität des Wachstums nach diesem Zeitpunkt ab. Die eine minimale Menge Nikotinsäureamid enthaltende Kultur war nach 72 Stunden, die Kontrolle nach 48 Stunden frei von lebenden Bakterien.

Es ist ganz klar, dass die nikotinsäureamidfreie Kultur — abgesehen von einer vorübergehenden Entwicklung bedingt durch die Vitaminreserve der Bakterien — vollkommen entwicklungsunfähig

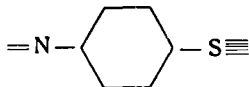
ist, obwohl der Nährboden sonst dem Bakterium vollkommen entspricht. Die fortpflanzungsunfähigen Bakterien gehen nach kurzer Zeit zugrunde, obwohl keine solche Schädigung vorhanden ist, die ihre Vernichtung hervorrufen könnte. Die Lebensbedingungen der Bakterien sind auch in den nikotinsäurefreien Röhrchen so lange gesichert, bis sie fortpflanzungsfähig sind, d. h. bis ihre Vitaminreserven den Bedarf decken. Das Aufhören der Fortpflanzung bedeutet für sie den Tod, wahrscheinlich darum, weil das veralterte Individuum dem Tod anheimfallen muss.

Der besprochene Versuch scheint als Analogie für die Veranschaulichung der antibiotischen Eigenschaften des Sulfanilamid ein ausgezeichnetes Beispiel zu sein. Die Verhinderung der Plasmasyntese, die Bakteriostase, gewährt für das Verständnis der therapeutischen Wirkung selbst dann eine hinreichende Erklärung, wenn das Arzneimittel keine primären bakteriziden Eigenschaften besitzt.

## V. Kapitel.

### Beziehungen der chemischen Struktur zur Wirkung.

Dank der in bezug auf den Wirkungsmechanismus der Sulfanilamidderivate gewonnenen Kenntnisse hat die Unsicherheit, die in diesem Problemkomplex noch vor kurzem vorherrschte, nun aufgehört. Da die Sulfanilamidwirkung auf der Ausschaltung des p-Aminobenzoessäure-Fermentes fusst, kann diese Wirkung — wie oben erörtert — von verschiedenen Verbindungen ähnlicher Molekularstruktur herbeigeführt werden. Demnach ist diese Wirkung nicht nur den Derivaten der Sulfanilsäure bzw. des Sulfanilamid eigen. Weder die  $-NH_2$ -Gruppe, noch das Schwefelatom gilt als die wesentliche Voraussetzung der Sulfanilamidwirkung. Schwefelfreie, in para-Stellung substituierte Anilin und, Nitrobenzolderivate (z. B. die p-Nitrobenzoessäure) können die für die Sulfanilamide typische bakteriostatische Wirkung entfalten. Eines steht aber über jeden Zweifel: dass die Atomgruppe

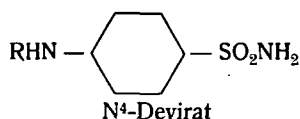
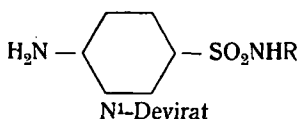


in den wichtigsten chemotherapeutischen Präparaten, die sich in der Praxis bewährt haben, immer vorhanden ist.

Früher, als das Wesen der Sulfanilamidwirkung noch nicht geklärt war, trachtete man die Wirksamkeit dieser Verbindungen mit Hilfe der mannigfaltigsten Substitutionen zu steigern. In den der Pron-tosilentdeckung folgenden Jahren wurden Tausende dieser Verbindungen hergestellt und in chemotherapeutischen Versuchen zum grossen Teil ausprobiert. In das Verzeichnis von *Northey*<sup>200</sup> wurden bis April 1940 über 1300 Präparate eingetragen, und von 45% der Präparate standen ihm auch Daten über ihre chemotherapeutische Wirksamkeit zur Verfügung. Heute kann die Zahl der zu chemotherapeutischen Zwecken hergestellten Verbindungen auf rund 3000 geschätzt werden. Obwohl die Mehrheit dieser Verbindungen in systematischen pharmakologischen und therapeutischen Versuchen noch

nicht geprüft wurde, bieten sie, abgesehen von einem Bruchteil, scheinbar keinen Vorteil im Vergleich mit dem Sulfanilamid. Die Zahl der Präparate, die in der Praxis auf breiter Basis verwendet werden, ist kaum einige Dutzend. Der Arzneischatz ist besonders durch die Einführung der heterozyklischen Derivate bereichert worden, einen Fortschritt *dem Wesen nach* bedeuten aber auch diese Verbindungen nicht. Zur Behandlung von Virusinfektionen, gewissen bakteriellen Erkrankungen (Typhus, Tuberkulose usw. oder von Rickettsieerkrankungen) haben sie sich nicht bewährt.

Die systematische Behandlung dieses Problems ist unserer Ansicht nach um so weniger angebracht, da dem Problem, wenigstens in gewisser Beziehung, lediglich literaturgeschichtliches Interesse zukommt. Dies gilt auch von den Verbindungen, die durch Substitution in den Benzolring des Sulfanilamid gewonnen wurden, da die auf diese Weise hergestellten Derivate (z. B. durch Einführung der  $-\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_2$ ,  $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ ,  $-\text{CH}_3$  usw. Gruppen) ausnahmslos unwirksam sind.<sup>41, 104, 105, 362</sup> Die entscheidende Bedeutung der para-Lage wurde schon oben erwiesen. Von der Unwirksamkeit der Orthanil- und Metanilsäurederivate haben sich mehrere Verfasser<sup>121, 287, 362</sup> überzeugt. Die meisten Forscher befassten sich mit der Substitution in die Amino- oder Sulfoamid-Gruppe. In diesem Zusammenhang erachten wir es als notwendig, auf ein Abkommen bezüglich der Nomenklatur hinzuweisen. Zur Vereinheitlichung der Nomenklatur haben Crossley, Northey und Hulquist<sup>63</sup> (1938) folgende Bezeichnungen für die Derivate vorgeschlagen:



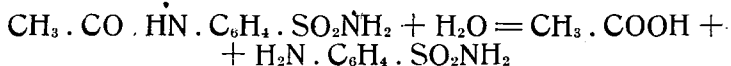
zur Bezeichnung des Radikals  $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2$  — wird das Wort Sulfanyl empfohlen. Wird dieses Säureradikal zu einem Amin umgesetzt, so entstehen die Sulfanilylamido- oder Sulfanilamido-Verbindungen. Dementsprechend müsste z. B. das Sulfathiazol 2-Sulfanilylamidothiazol oder 2-Sulfanilamidothiazol genannt werden.

Spricht man von dem Zusammenhang zwischen Struktur und Wirkung, so ist die therapeutische (in vivo) Wirkung von der bakteriostatischen (in vitro) scharf zu trennen. Es konnte nämlich über jeden Zweifel hinaus bewiesen werden, *dass ein Teil der Sulfanilamid-derivate, die  $\text{N}^4$ -Derivate, nur nach einer im Organismus vor sich gehenden Aenderung wirksam werden, während die ursprüngliche Verbindung im Reagenzglas vollkommen unwirksam ist. Derartige Verbindungen zeigen also ursprünglich keine Sulfanilamid-Wirkung.* In diesen zwei Sätzen ist das Wesen unserer Kenntnisse über die  $\text{N}^4$ -Derivate enthalten, zur Ergänzung sei noch folgendes hinzugefügt: Im Schrifttum findet man vereinzelt Angaben über einige  $\text{N}^4$ -Derivate, die wirksamer als die Muttersubstanz, Sulfanilamid, sein sollen. Allerdings fassen diese Angaben auf einer kleinen Zahl von Versuchen, die unter nichtentsprechenden Bedingungen durchgeführt wurden, weshalb ihre Richtigkeit von vornherein als zweifelhaft erscheint. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein  $\text{N}^4$ -Derivat sich als überlegen der Mutterverbindung erweist, ein solches Derivat



hätte aber entsprechende pharmakologische Eigenschaften aufzuweisen, u. zw. bessere Resorbierbarkeit als die der Mutterverbindung und eine hochgradige oder vollständige Spaltung im Organismus.

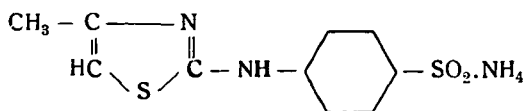
Von den möglichen N<sup>4</sup>-Derivaten wurde eine Anzahl hergestellt und therapeutisch geprüft. Alkyl-, Aryl- und heterozyklische Radikale und Säurereste wurden substituiert, ferner stellte man auch Schiff-Basen, Azoderivate, usw. des Sulfanilamid her. Eines der einfachsten Acylderivate, das Acetylsulfanilamid, ist in Tierversuchen weniger wirksam als die Grundverbindungen.<sup>278, 302</sup> Im Reagenzglasversuch ist selbstredend auch dieses Präparat vollkommen unwirksam.<sup>165, 178</sup> Die mit höheren Fettsäureresten substituierten Sulfanilamiderivate wurden von *Miller*<sup>278</sup> und seinen Mitarbeitern geprüft. Sie beobachteten ein Ansteigen der Wirksamkeit bis zum N<sup>4</sup>-valeryl- und -caproyl-Sulfanilamid. Diese Verbindungen sind dem Sulfanilamid fast ebenbürtig. Die Erklärung dieser Erscheinung wird von *Kohl* und *Flynn*<sup>196</sup> geliefert: die im Organismus vor sich gehende Hydrolyse der Verbindungen nehme bis zu einer gewissen Kettenlänge zu. In vitro sind aber diese Verbindungen ausnahmslos unwirksam. Die Entwicklung der Pneumokokken wurde von dem N<sup>4</sup>-caproylsulfanilamid nach *Jensen* und *Schmith*<sup>178</sup> selbst in der Konzentration 1:2000 nicht gehemmt, zugleich wirkte das Sulfanilamid schon in einer Verdünnung von 1:10.000. Die Acetyl- und Succinyl-derivate konnten das Wachstum der Staphylo- und Streptokokken sogar in dem keinen Interferenzstoff enthaltenden Caseinnährboden nicht verhindern.<sup>165, 167</sup> Die Spaltung der Acylderivate, z. B. des Acetyl-derivates, findet im Organismus durch Hydrolyse statt:



Wahrscheinlich handelt es sich um eine umkehrbare Reaktion, da der Organismus die Sulfanilamide durch Acetylierung entgiftet.

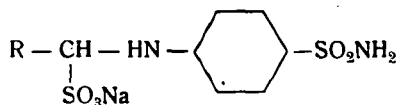
Das wichtigste N<sup>4</sup>-Derivat, das Prontosil, ist im Reagenzglasversuch selbst unter den idealsten Bedingungen unwirksam.<sup>165</sup> Die reduktive Spaltung dieser Verbindung im Organismus, in deren Folge aus dem Präparat eine wirksame Verbindung entsteht, wurde bereits besprochen. Auch der Wirksamkeit des im Anfang der Sulfanilamidepoche so oft gelobten Benzylsulfanilamid ( $\text{C}_6\text{H}_5 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{HN} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2\text{NH}_2$ ) liegt seine reduktive-Spaltung zugrunde. Die Verbindung wurde unter dem Namen Septasine und Proseptasine hauptsächlich in England und Frankreich verwendet. *Whitby*,<sup>377</sup> *Lockwood* und *Robinson*<sup>229</sup> haben damals festgestellt, dass seine Wirkung ungefähr dem des Sulfanilamid gleichkommt. Die Verfasser haben auch darauf hingewiesen, dass von dem Präparat eine chemotherapeutische Wirkung nur in dem Falle zu erwarten ist, wenn die Konzentration des aus ihm abgespaltenen Sulfanilamid mindestens 3 mg % erreicht. *James* und *Fuller*<sup>173</sup> haben nachgewiesen, dass im Mäuseorganismus nach der Einführung von 10 mg Sulfanilamid von 1,86 mg resorbierter Menge 1,83 mg gespalten und hiervon 1,52 in freiem und 0,31 mg in gebundenem Zustand mit dem Urin ausgeschieden werden. Der Spaltungsgrad der Verbindung ist also ziemlich günstig. Der Organismus scheint die Fähigkeit zu besitzen, von den verschiedenen N<sup>4</sup>-Derivaten Sulfanilamid abzuspalten. Wir

(Ivánovics und Diczfalusy<sup>165</sup>) haben gefunden, dass das Thioureido-benzolsulfonamid ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{CS} \cdot \text{HN} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2\text{NH}_2$ ), ferner das 4-Methylthiazol-sulfanilamid



die selbst bei Anwesenheit von Wasserstoff in statu nascendi in einem schwefelsäurigen Medium verhältnismässig schwer gespalten werden, im Mäuseorganismus eine kleine Menge von diazotierbarem und einen Farbstoff lieferndem Produkt erzeugen lassen; mithin wird aus ihnen Sulfanilamid frei. Im Blut der Mäuse, die 25 mg der Ureidsuspension erhielten, wurde nach 3 bzw. 6 Stunden ein Sulfanilamidspiegel von 0,4—0,6 mg % nachgewiesen (Durchschnitt von je 5 Tieren). In dem in der 6. Stunde entleerten Urin wurden 17 mg % Sulfanilamid gefunden, in dem nach 24 Stunden entleerten noch immer 6 mg %. Obiges Methylthiazolderivat wird im Organismus nur in Spuren zu Sulfanilamid gespalten. Nach der Fütterung von 25 mg Suspension enthält das Blut nur 0,2 mg %, der Urin 1,5—2,0 mg % Sulfanilamid.

Mit Rücksicht auf ihre gute Löslichkeit sind jene  $\text{N}^4$ -Derivate, die unter Aldehydbisulfitwirkung entstehen und folgende Struktur haben,



besonders wert des Interesses (R bedeutet das dem verwendeten Aldehyd entsprechende Alkyl, im Falle des Formaldehyds bedeutet R ein Wasserstoffatom). Diese Verbindungen sind in vitro cca  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{2}$  so wirksam wie das Sulfanilamid.<sup>165</sup> Die bakteriostatische Wirkung des methylensulfoxysauren Sulfanilamid (es wurde ein steriles Handelspräparat untersucht) wurde im Caseinnährboden gegen Streptokokken mol/7.200 gefunden, die Wirksamkeit des Sulfanilamid war gleichzeitig mol/22.000. Auf Grund der p-Aminobenzoessäure-Interferenz konnte festgestellt werden, dass 1 mol dieser Säure die Wirkung von 9.990 mol Sulfoxysäurederivat, vom Sulfanilamid aber nur 3.250 mol aufhob. Die Vergleichung der bakteriostatischen Wirkung der zwei Präparate liefert einen Quotienten  $22.000:7.200 = 3,2$ , der mit dem Interferenzquotienten gut übereinstimmt ( $9.990:3.250 = 3,1$ ). Dies bedeutet, dass *die bakteriostatische Wirkung der untersuchten methylensulfoxysauren Sulfanilamidnatriumlösung nur von der Menge des frei werdenden Sulfanilamid abhängt*. Es gibt auch andere Untersuchungen die sich in diesem Sinne auslegen lassen; in den Versuchen von Diczfalusy und Eözlös<sup>72</sup> wirkte das Präparat gegen die Streptokokkensepsis der Mäuse gerade mit einer Intensität, die dem Sulfanilamidgehalt seiner Lösung entsprach, bzw. die In-vivo-Wirkung war etwas stärker, da die Verbindung im Organismus scheinbar besser gespalten wird als in dem neutralen Medium des Reagenzglases. Hingegen geht die Spaltung des methylensulfoxysauren Sulfanilamid in einem sauren Medium besser als im Orga-

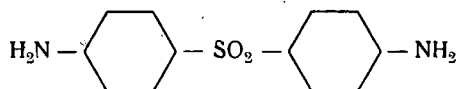
nismus vor sich; in der 10%-igen Trichloressigsäure befinden sich 84% des Präparates in freiem Zustand.

Das von *Klarer*<sup>190</sup> hergestellte „Marfanil“ (früherer Name: „Mesudin“) ist chemisch p-(Aminomethyl)-benzolsulfonamid:

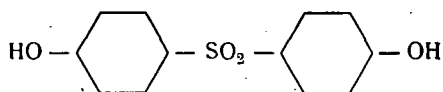


also eigentlich kein Sulfanilamidderivat, seine Besprechung darf aber wegen seiner praktischen Wichtigkeit nicht unterbleiben. Nach *Domagk*<sup>80</sup> komme seine chemotherapeutische Wirkung besonders bei anaeroben Infektionen zur Geltung; seine bakteriostatische Wirkung ist auf Staphylo- und Streptokokken unbedeutend, diese geringe Wirkung wird von der p-Aminobenzoesäure nicht behoben (*Ivanovics*<sup>165, 167</sup>). Gegen Pneumokokken (*Jensen, Schmith* und *Brandt*<sup>176</sup>) und Anaeroben (*Domagk*,<sup>80</sup> *Schreus*<sup>332</sup>) ist seine bakteriostatische Wirkung stark; merkwürdigerweise wird von der p-Aminobenzoesäure auch diese Wirkung nicht behoben, ein Beweis dafür, dass der Wirkungsmechanismus der Verbindung von dem des Sulfanilamid abweicht.<sup>179, 332</sup>

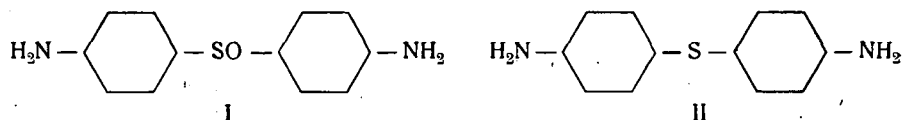
Dagegen wirkt die Sulfanilsäure ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_3\text{H}$ ) nach einem ähnlichen Mechanismus wie das Sulfanilamid, ihre bakteriostatische Wirkung ist aber erheblich schwächer.<sup>159, 165, 178, 281</sup> Schon wiederholt wurde hier erwähnt, dass das 4,4'-Diaminodiphenylsulfon



hinsichtlich der Wirksamkeit dem Sulfanilamid mehrfach überlegen ist. Vom Gesichtspunkte der Wirksamkeit ist die primäre Aminogruppe auch bei dieser Verbindung unerlässlich; so ist z. B. ihr Diacetylderivat im Reagenzrohr vollkommen unwirksam.<sup>165</sup> Die Verbindung wird im Organismus erst nach Abspaltung der Acetylgruppe wirksam.<sup>288</sup> Entgegen der Behauptung von *Levaditi, Girard* und *Vaisman*<sup>219</sup> erwies sich das dem vorerwähnten ähnliche 4,4'-Dioxydiphenylsulfon



als vollkommen unwirksam.<sup>165</sup> Im Reagenzglasversuch waren das 4,4'-Diaminodiphenylsulfoxyd (I) und das 4,4'-Diaminodiphenylsulfid (II) ebenfalls



wirkungslos (*Jensen* und *Schmith*<sup>178</sup>). Letztere Verbindungen werden im Organismus zum entsprechenden Sulfon oxydiert, wodurch ihre Wirksamkeit in vivo bedingt sein dürfte. Die anderen Sulfone wirkten

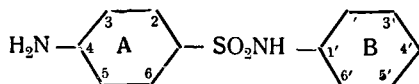
nicht; dies gilt z. B. auch vom p-Aminobenzolsulfonacetamid<sup>178</sup> ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$ ).

Die  $\text{N}^1$ -Derivate, bei denen das Wasserstoffatom der Sulfonamidgruppe substituiert wird, sind sowohl theoretisch, vom Gesichtspunkte des Wirkungsmechanismus, als auch praktisch erheblich wichtiger als die soeben besprochenen Verbindungen. Wie ersichtlich, kann eine Vervollkommnung der Sulfanilamidtherapie von der Anwendung der  $\text{N}^1$ -Derivate kaum erwartet werden, dagegen haben die  $\text{N}^1$ -Derivate den Arzneischatz schon bisher beträchtlich bereichert. Zahlreiche Mitglieder dieser Gruppe sind wirksamer als das Sulfanilamid, überdies sind die meisten nicht toxischer als die Grundverbindung, weshalb sie für die Praxis wesentliche Vorteile bieten.

Vom praktischen Gesichtspunkt aus kommt vor allem der therapeutischen Wirkung dieser Präparate Bedeutung zu, dennoch sind die In-vitro-Versuche unentbehrlich, da die Beziehungen zwischen chemischem Aufbau und Wirkung nur auf diesem Wege geklärt werden können. Die therapeutische Wirksamkeit hängt nämlich hochgradig von den pharmakologischen Eigenschaften der Verbindungen ab, ferner von anderen, bisher unbekannten im tierischen Organismus wirkenden Faktoren, unter deren Einfluss gewisse Präparate im Organismus anders wirken, als es auf Grund der Reagenzglasversuche erwartet werden könnte (s. auch Kap. VI.). Aus diesem Grunde werden im weiteren bei der Besprechung der Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und Wirkung nur die In-vitro-Versuche berücksichtigt, und dementsprechend wird unter Wirkung immer die In-vitro-Wirkung verstanden. Auf die therapeutische Wirkung wird nur in einzelnen Fällen eingegangen, wo es aus besonderen Gründen nötig erscheinen wird. Bei der Besprechung der  $\text{N}^1$ -Derivate wollen wir der Übersichtlichkeit halber Untergruppen unterscheiden.

**Azyklische  $\text{N}^1$ -Derivate:** In bezug auf ihre In-vitro-Wirkung sind Literaturdaten ziemlich spärlich vorhanden. Die Wirkung wird von der *Alkyl*-Gruppe herabgesetzt; das Sulfanil-dimethylamid ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$ ) ist erheblich weniger wirksam als das Sulfanilamid<sup>178</sup>. Die Einführung von *Säureresten* hat gleichfalls eine Wirkungsabnahme zur Folge; die p-Aminobenzol-sulfoamino-essigsäure ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{HN} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{COOH}$ ) ferner ihr Homolog, die entsprechende Propionsäure, schliesslich die p-Aminobenzolsulfonamido-aethansulfosäure ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{HN} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{SO}_3\text{H}$ ) wirken auf Streptokokken beträchtlich schwächer als das Sulfanilamid.<sup>165</sup> Die Substitution mit der *Guanidyl*-Gruppe führte zur Herstellung des heute beliebten Sulfanilylguanidin ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{HN} \cdot \text{CNH} \cdot \text{NH}_2$ ), das ungefähr gleich wirksam ist wie das Sulfanilamid und sein Carbamidderivat<sup>165</sup> ( $\text{H}_2\text{N} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{HN} \cdot \text{CO} \cdot \text{NH}_2$ ). Hingegen können einzelne *Acylderivate* wesentlich wirksamer sein als das Sulfanilamid; dies bezieht sich auf das p-Aminobenzolsulfoacetamid (Albucid),<sup>113, 165, 178</sup> ferner auf das  $\text{N}^1$ -Dimethylacrylylsulfanilamid (Irgamid).<sup>113, 800</sup>

**Isozyklische  $\text{N}^1$ -Derivate:** Auch über die bakterioostatische Wirkung dieser Verbindungen stehen nur wenig Literaturangaben zur Verfügung. An erster Stelle stehen die *Anilide* mit folgender allgemeiner Formel:



Die Wirkung einer Anzahl von Aniliden ist aus Tabelle 25. ersichtlich. Die bakteriostatischen Titerwerte wurden im Caseinnährboden bestimmt.<sup>165</sup>

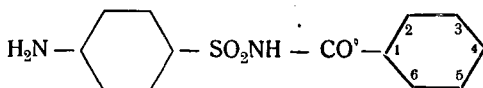
Tabelle 25.

*Die bakteriostatische Wirkung von verschiedenen Anilide gegen Streptococcus haemolyticus.*

| Verbindung                                     | Bakteriostatischer Titer |
|--|--------------------------|
| 4-Aminobenzosulfoanilid                        | mol/45.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-2'-chloranilid              | mol/42.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-2'-methylanilid             | mol/28.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-2'-hydroxyanilid            | mol/46.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-2'-carboxyanilid            | mol/47.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-3'-carboxyanilid            | mol/18.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-hydroxyanilid            | mol/28.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-nitroanilid              | mol/332.000              |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-aminoanilid              | mol/58.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-carboxyanilid            | mol/6.200                |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-dimethylsulfoaminoanilid | mol/47.000               |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-oxy-5'-carboxyanilid     | mol/3.300                |

Wie ersichtlich, wird die Wirkung auch durch die Substitution am Ring B wesentlich beeinflusst. Die Zahl der untersuchten Verbindungen reicht zur Festlegung einer allgemeingültigen Regel nicht aus, folgendes kann jedoch festgestellt werden: 1. Die Anilide sind im allgemeinen wirksamer als das Sulfanilamid, es gibt aber einzelne mit beträchtlich schwächerer Wirkung. 2. Auffallend ist die energische Wirkung des 4'-Nitroderivates. 3. Von den Oxy- und Carboxyderivaten sind die 2'-Derivate wirksamer als die 4'-Derivate.

Den *isozyklischen Acylderivaten* wird neuerdings infolge Arbeiten von *Läuger* und *Martin*,<sup>213</sup> ferner *Pulver* und *Suter*,<sup>301</sup> erhöhte Aufmerksamkeit zugewendet. *Pulver* und *Martin*<sup>300</sup> studierten die Wirkung einer Anzahl von Benzoylderivaten. Sie haben festgestellt, dass die Wirkung dieser Derivate



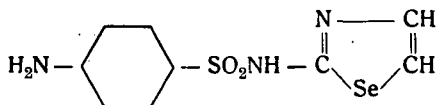
gegenüber den Colibazillen von den eingeführten Gruppen sehr verschieden abhängig sein kann. Einzelne, wie z. B. das N<sup>1</sup>-(3,4-Dimethylbenzoyl)-sulfanilamid (Irgafen), sind dem Sulfathiazol gleichwertig, während einige, z. B. die Isomerverbindung der vorigen, vollkommen unwirksam bleiben. Die meisten Derivate dieser Gruppe sind ungefähr halb so wirksam wie das Sulfathiazol.

In Bezug auf die Wirkung des Disulfanilamid  $[(H_2N \cdot C_6H_4 \cdot SO_2)_2NH]$  konnte ich keine Angaben über In-vitro-Versuche finden. Hinsichtlich seiner therapeutischen Wirksamkeit sind die Ergebnisse widersprechend;<sup>296</sup> einige Verfasser halten das Mittel für stärker, andere für schwächer als das Sulfanilamid, auch über seine vollkommene Unwirksamkeit liegen Berichte vor.

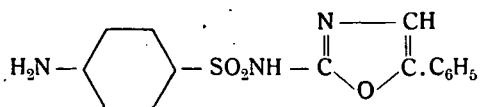
Die *Naphtalinderivate* des Sulfanilamid wie das 1-Sulfamethyl-naphtalin und das 4-Sulfahydroxynaphtalin sind ungefähr fünfmal so wirksam wie das Sulfanilamid (*Frisk*).<sup>113</sup>

*Heterozyklische N<sup>1</sup>-Derivate*: Zweifelsohne haben sich diese Derivate in der Therapie am besten bewährt. Dem von *Whitby*<sup>378</sup> zuerst geprüften Sulfapyridin sind die Thiazolderivate des Sulfanilamid in vieler Hinsicht überlegen; neuerdings sind stellenweise hinwiederum die Pyrimidinderivate populär geworden. Die *heterozyklischen Derivate* verdienen sicherlich die grösste Aufmerksamkeit; sie sind die *wirksamsten und verhältnismässig am wenigsten toxischen Verbindungen*. In den Versuchen von *Frisk*<sup>112</sup> waren 19 heterozyklische Derivate mit Ausnahme des Sulfathiodiazol vielfach wirksamer als das Sulfanilamid. Von den 1-heteroatomigen Verbindungen ist das Sulfapyridin wirksamer als das Sulfapyrrol. Im allgemeinen sind jene, die 2 Heteroatome enthalten, wirksamer als die mit nur 1 Heteroatom. Das Sulfathiazol, 4-Sulfamethylthiazol, 5-Methylthiazol und das 4-Phenyl-5-methylthiazol sind im Reagenzglasversuch gegen die verschiedensten Krankheitserreger ungefähr 15-mal wirksamer als das Sulfanilamid.<sup>112, 159, 165, 178</sup> Das 4,5-Dimethylthiazol und das 4-Aminothiazol sind etwas weniger wirksam, während das Sulfathiazolin, dessen Ring zum Teil gesättigt ist, kaum stärker wirkt als das Sulfapyridin.<sup>159, 165, 178</sup> Merkwürdigerweise sind die mit -COOH substituierten Sulfathiazolderivate nur wenig wirksamer als das Sulfanilamid.<sup>178</sup> Von den zwei N-Atome enthaltenden heterozyklischen Verbindungen sind Sulfapyrimidin und seine Derivate viel wirksamer als das Sulfapyridin, sie wirken aber schwächer als die Thiazolderivate.

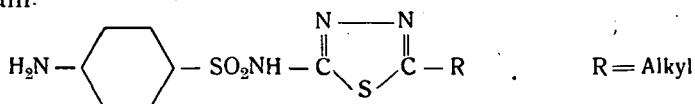
Von den anderen heterozyklischen Verbindungen sollen noch die selenthaltigen erwähnt werden: 2-Sulfanilamido-selenazol



und sein 4-Methylderivat sind dem Sulfathiazol ebenbürtig.<sup>178</sup> Ungefähr die gleiche Wirkung hat auch das 2-Sulfanilamido-5-phenyloxazol:<sup>178</sup>

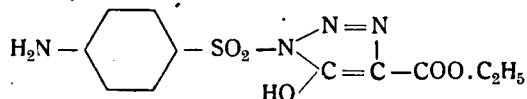


*Vonkennel* und *Kimmig*<sup>369</sup> halten die Verbindungen mit drei Heteroatomen, die verschiedenen Thiodiazolderivate, für sehr wirksam.



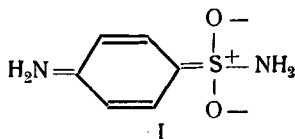
Nach *Jensen* und *Schmith*<sup>177, 178</sup> könne auf grund theoretischer Überlegungen von den N<sup>1</sup>-Derivaten im voraus gesagt werden, ob sie wesentlich wirksamer sein werden als das Sulfanilamid. Die Affinität der NH<sub>2</sub>-Gruppe zum Apoferment der p-Aminobenzoesäure wird von dem zur aromatischen Aminogruppe in p-Stellung befindlichen Sulfamidoradikal bzw. von den darin substituierten Gruppen in induktiver Weise beeinflusst. Eine Sulfanilamidwirkung komme den Anilinderivaten zu, deren in der p-Stellung befindliche Atomgruppe ein grosses Dipolmoment besitzt, ohne einen Elektromereffekt zu haben. Die Substitution in der Sulfanilamidgruppe kann, wie gezeigt wurde, eine beträchtliche Steigerung der Wirkung zur Folge haben, die Wirkung hängt aber hochgradig von der eingeführten Gruppe ab. In diesem Zusammenhang heisst es bei *Jensen* und *Schmith*: „Einführung von Substituenten in der Sulfamidgruppe des Sulfanilamids ruft nur dann eine Vergrösserung der bakterio statischen Wirkung hervor, wenn die Substituenten mesomerfähig (resonanzfähig) sind.“ Die vollkommen hydrierten heterozyklischen Derivate können daher nicht wirksamer sein als das Sulfanilamid. Die Resonanzfähigkeit sei auch dafür verantwortlich, dass die Derivate mit mehreren Heteroatomen denen mit 1 Heteroatom überlegen sind.

Zahlreiche Beobachtungen und Beispiele scheinen die Auffassung von *Jensen* und *Schmith* zu erhärten, obwohl die Regel in vielen Fällen für ungültig befunden wurde. So wurde das mesomerfähige Sulfanilazid und das 1-Sulfanilyl-4-carbaethoxy-5-oxy-1, 2, 3-triazol



von *Ekstrand*<sup>86</sup> kaum wirksamer befunden als das Sulfanilamid.

Diese Ergebnisse *Ekstrands* sprechen also gegen die Annahme, dass für die Wirksamkeit der N<sup>1</sup>-Derivate die Mesomerfähigkeit entscheidend wäre. Für uns war es sogar fraglich, dass eine sich auf das ganze Molekül erstreckende Mesomerfähigkeit bei den Sulfanilamidderivaten überhaupt möglich ist. Auf Grund ihrer in Dioxan durchgeführten Dipolmomentmessungen glauben *Kumler* und *Halverstadt*<sup>208</sup> — *Jensen* und *Friediger*<sup>176</sup> haben sich dieser Auffassung angeschlossen — dass die Sulfanilamidmoleküle zum Teil — nach *Kumler* und *Halverstadt* zu 3% — in der untenstehenden „Zwitterion“-Form (I) vorkommen. Die therapeutische Wirksamkeit beruhe auf dieser Form, demnach wäre für die Wirkung nur ein Bruchteil der Moleküle von Bedeutung.



Die Richtigkeit dieser Ansicht wurde von uns — in Gemeinschaft mit v. *Kiss*<sup>189</sup> — experimentell überprüft, indem die Lichtabsorptionskurven der verschiedentlich wirksamen N<sup>1</sup>-Derivate aufgenommen wurden. Zu diesem Zweck wurden zahlreiche Verbindun-

nach der notwendigen weiteren Reinigung in absolutem Alkohol gelöst und mit Hilfe des Zeiss'schen Spektrographen f. Chemiker die Extinktionskurven bestimmt.<sup>188</sup> Die auf diese Weise gewonnenen Lichtabsorptionskurven nebst der In-vitro-Antistreptokokkenwirkung sind auf Abb. 8. und 9. dargestellt.

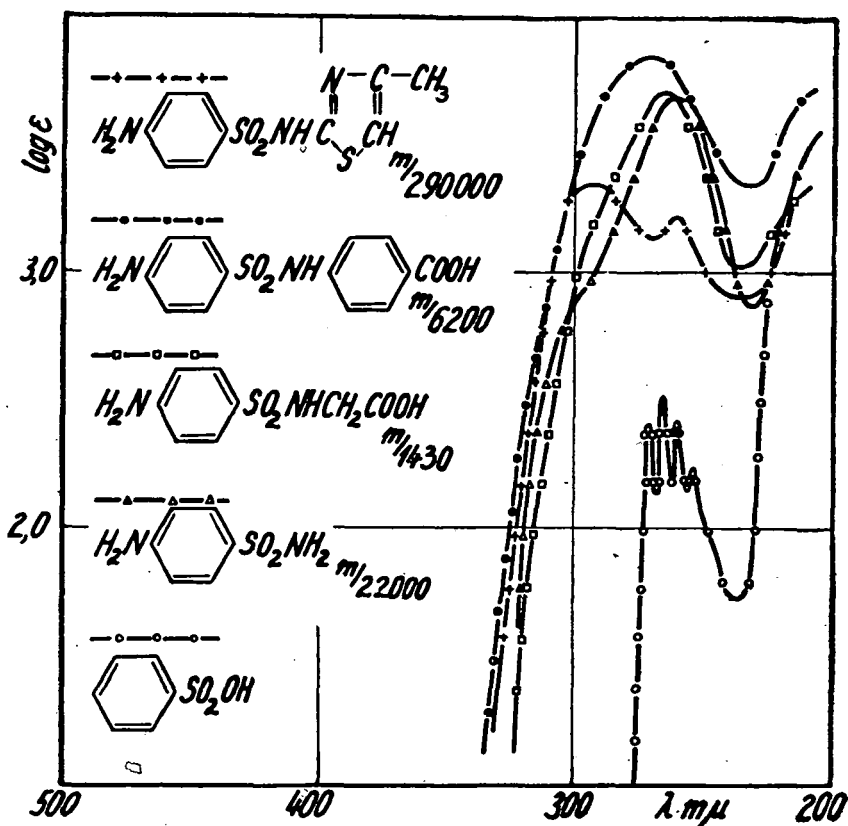


Abb. 8.

Absorptionsspektren von verschiedenen Sulfanilamidderivaten.

Schon aus diesen wenigen Absorptionskurven geht hervor, dass die Sulfanilamidderivate sich gegenüber den Wellenlängen über  $300 \mu\mu$  ebenso verhalten wie das Anilin oder das p-Aminobenzamid. Das Absorptionsbild der Benzolsulfosäure weicht von diesem vollkommen ab und entspricht dem des Benzols.

Sonach kann die Gültigkeit der Formel I für die Sulfanilamide im Wege der Spektroskopie nicht bestätigt werden. In diesem Fall wäre nämlich an der Grenze des Sichtbaren und des Ultravioletten eine für die Chinoidalstruktur charakteristische Bande vorhanden. Wir wollen aber nicht leugnen, dass die Messung der Dipolmomente für die Bestätigung der Existenz der Formel I einen empfindlicheren Indikator darstellt; da nun diese Mesomerform nur von 3% der Sulfanilamidmoleküle aufgewiesen wird, eignet sich die Spektroskopie zum Nachweis dieser Formel nur bei einer sehr günstigen Lage der



Banden. Hingegen ist das Sulfamethylthiazol ungefähr 15-mal wirksamer als das Sulfanilamid; wäre die Zahl der Moleküle mit einer Chinoidalstruktur für die Wirkung ausschlaggebend, so müsste sich schon die Hälfte der Sulfamethylthiazolmoleküle in diesem Zustand befinden. Nun lässt sich aber die Chionidalstruktur bei dieser Verbindung auf grund der Absorptionskurve überhaupt nicht erkennen.

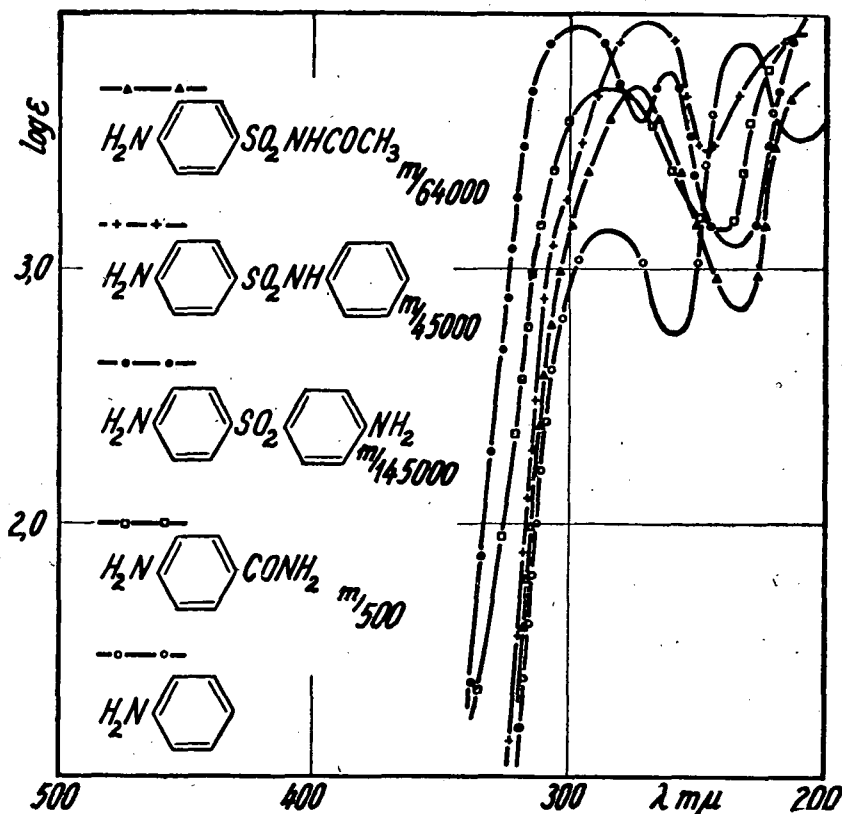
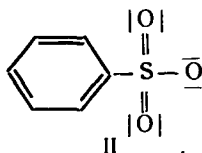


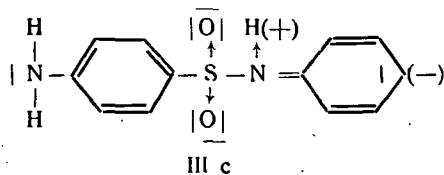
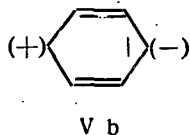
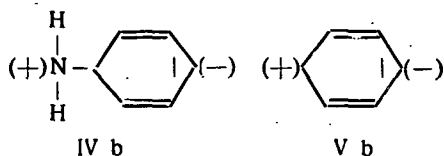
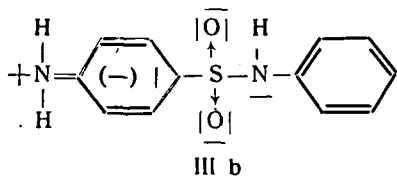
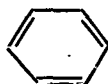
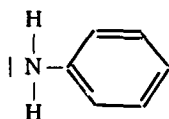
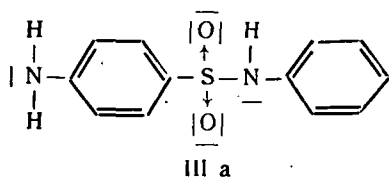
Abb. 9.

Absorptionsspektren von verschiedenen Sulfanilamidderivaten.

Da der negative spektroskopische Befund im allgemeinen nicht als entscheidend angesehen wird, scheint die unbezweifelbare experimentelle Lösung des Problems — abgesehen von der Messung des Dipolmomentes — aussichtslos zu sein. Wir wollen daher den durch unsere Versuche gelieferten Widerspruch nicht als entscheidend betrachten, glauben aber, dass sie die theoretischen Kenntnisse, die gleichfalls gegen Formel I sprechen, unterstützen. Die oft angenommene Formel II der Benzolsulfosäure mit 12 äusseren Elektronen beim Schwefelatom ist höchst unwahrscheinlich (Hückel,<sup>153</sup> Eisterl<sup>85</sup>). Aus demselben Grund scheint auch die von Kumler und Halverstadt angenommene 10-Elektronen Formel des p-Aminobenzolsulfonamids unwahrscheinlich zu sein. Abgesehen davon erscheint die Existenz



dieser Formel auch wegen der benachbarten gegenteiligen Landungen als sehr unwahrscheinlich (Wehland und Pauling<sup>372</sup>). Auf Grund dieser theoretischen Überlegungen dürften die Mesomeriefälle nur isoliert und von der Sulfoamidgruppe unabhängig zustande kommen. Dementsprechend sind die Mesomermöglichkeiten des p-Aminobenzolsulfonanilids folgende: IIIa, IIIb, IIIc, und auch andere, die abzubildend überflüssig erscheint. Demnach sind im A-Ring dieselben Mesomerien möglich wie die elektromeren Grenzstrukturen des Anilins in einer neutralen Lösung. Im Ring B sind nur die mesomeren Grenzstrukturen des Benzols möglich (Va und Vb). Somit ist die Sulfoamidgruppe das trennende Glied zwischen den mesomerfähigen Atomgruppen, weshalb den Atomgruppen,



die gegenüber der Anilingroupen liegen, auf dem Wege über die Mesomerie keine Induktionswirkung zugeschrieben werden dürfte.

Unserer Ansicht nach sprechen nicht nur die Experimente (Ekstrand) sondern auch theoretische Bedenken gegen die Annahme, dass bezüglich der Wirkung die Mesomerfähigkeit der im N<sup>1</sup> substituierten Atomgruppen ausschlaggebend sei. Wir glauben daher, dass für die Tatsache, wonach die Derivate dem Sulfanilamid zum Teil überlegen sind, eine andere Erklärung zu suchen sei.

Neuerdings wollen amerikanische Verfasser die Abhängigkeit der Wirksamkeit von dem Säurecharakter der Sulfanilamide nachweisen. Bell und Roblin<sup>15</sup> glauben einen Zusammenhang zwischen der Wirkung und der Dissoziationskonstante gefunden zu haben. Bei

der Darstellung des Zusammenhanges mit Hilfe einer Funktion wurden zwei einander entgegenwirkende Faktoren gefunden, von denen die Wirkung abhängt; der eine dieser Faktoren steigert die Wirkung in dem Ausmasse wie der  $pK$ -Wert der einzelnen Verbindungen ansteigt, die Zunahme des anderen dagegen hat die Herabsetzung der Wirkung zur Folge.

*Kimmig* und *Weselman*,<sup>187</sup> *Davis* und *Wood*<sup>68, 69</sup> haben beobachtet, dass die Sulfanilamide mit Eiweisskörpern Komplexe bilden. Entsprechend diesen Beobachtungen sei die Wirkung der Sulfanilamide die Funktion ihrer Fähigkeit, Eiweisskomplexe bilden zu können. Auf Grund dieser zwei Varianten — Dissoziationskonstante und komplexbildende Eigenschaft — wurde die Wirkung von *Klotz*<sup>194</sup> in einer Formel ausgedrückt.

Vor Besprechung dieser Formel sei noch einmal auf die die Sulfanilamidwirkung ausdrückende Reaktion hingewiesen, die dem Gesetz der Massenwirkung gerecht wird und dem Wesen nach einen Wettbewerb zwischen dem Sulfanilamid und der *p*-Aminobenzoesäure um das eiweissartige Apoenzym darstellt (s. S. 85). Nach *Klotz* reagiere in der Lösung der schwachsauren Sulfanilamide (Sulfanilamid, Sulfathiazol) vom Typ HS (= Sulfanilamid mit einem Säurecharakter) das Anion S als Base mit dem sauren Enzymeiweisskörper P und es komme zur Entstehung von PS-Komplexen, deren Menge der des Anions S entspreche. Je grösser das Ausmass dieses Komplexes, desto energischer die Sulfanilamidwirkung. Von den verschiedenen Sulfanilamidderivaten wird jenes Präparat das wirksamste sein, dessen Dissoziationswert  $pK$  mittelgross ist, da die Bedingungen der Entstehung der PS-Komplexe bei diesem am meisten gegeben sind. Ist das Sulfanilamid eine sehr schwache Säure, so ist die Zahl der S-Ionen sehr niedrig; hat das Präparat einen starken Säurecharakter, so kann in einem neutralen Medium (bei pH 7,0) trotz der hohen Zahl der S-Ionen wegen der schwachalkalischen Beschaffenheit des  $S^-$  nur wenig PS entstehen.

Dasselben gilt nach *Klotz* für die Sulfanilamide alkalischer Natur (z. B. Sulfanilylguanidin) mit dem Unterschied, dass hier das alkalische Molekül S die Rolle des Komplexbildners übernimmt.

Auf grund dieser Überlegungen wurde von *Klotz* obiger Zusammenhang wie folgt formuliert:

$$pK_{HS} = pH - \log \frac{1-f}{f} \quad \dots \dots \dots (1)$$

wo

$$f = \frac{d \ln K_{PS}}{d \ln K_{HS}} \quad \dots \dots \dots (2)$$

$K_{PS}$  ist die Dissoziationskonstante des Sulfanilamid im Falle eines Enzym-Sulfanilamid-Synplexes, also dasselbe, wie in Formel II auf Seite 85, die auf dem Massenwirkungsgesetz beruht. Ermittelt man den Wert von  $f$ , der für jede Bakteriumart und jeden Stamm verschieden ist, so kann der Wert von  $pK_{HS}$  berechnet werden. Der Wert von  $f$  hängt von den Eigenschaften des eiweissartigen Apoenzyms ab, das an der Synplexbildung teilnimmt. Nach *Davis* und *Wood* könne der relative  $K_{PS}$ -Wert aus dem  $K_{HS}$  der verschiedenen Sulfanilamide errechnet werden. Für das Serumalbumin ist  $f = 0,5$ .

Nach den Ergebnissen von *Bell* und *Roblin* wurde von *Klotz* für Colibazillen  $f = 0,3$  gefunden.

Auf Grund desselben Gedankenganges kann auch der Wert der p-Aminobenzoesäure-Interferenz errechnet werden. Hier ist aber ein Verhältnis PA:PS ( $A = p$ -Aminobenzoesäure) anzunehmen, bei dem die Hemmung beginnt bzw. die Entwicklung einsetzt. Auch von diesem Zusammenhang gilt der auf S. 85 angegebene Gleichgewichtszustand.

## VI. Kapitel.

# Mechanismus der therapeutischen Sulfanilamidwirkung.

## 1. Kommt die bakteriostatische Wirkung im Organismus zur Geltung ?

In der Einleitung wurde schon erwähnt, dass die Frühversuche mit der Chemotherapie der bakteriellen Infektionen scheiterten, weil die antibiotischen Eigenschaften der in vitro wirksamen Verbindungen im tierischen Organismus nicht zur Geltung gelangten. Die Sublimatwirkung wird von den Eiweisskörpern des Serums — wahrscheinlich im Wege einer Komplexbildung — herabgesetzt, überdies wird die desinfizierende Fähigkeit des Quecksilberions von den Sulfhydrylverbindungen, z. B. dem Glutathion, beeinträchtigt (*Fildes*<sup>95</sup>). Die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide ist in vitro im Vergleich mit anderen Benzolderivaten ausserordentlich stark (s. Tabelle 36), so dass eine ähnliche Wirkung nur von den ziemlich toxischen Chinonen entfaltet wird. Es bleibt aber noch fraglich, ob die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide im Organismus zur Geltung kommt.

Im III. Kapitel wurde darauf hingewiesen, dass die bakteriostatische Wirksamkeit der Sulfanilamide auch in eiweisshaltigen Nährböden (Serum, Liquor) nachgewiesen werden kann; desgleichen im Urin, obwohl hier die Wirkung etwas schwächer ist als in den synthetischen Nährböden. Die Antwort auf die Frage ist deshalb schwer, weil die bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide im Blute gewisser Versuchstiere (Kaninchen, Maus) erheblich weniger als im Menschenblut zur Geltung kommt, obzwar die Infektionen dieser Tiere mit den Sulfanilamiden sehr günstig beeinflusst werden können. Die unter entsprechenden Bedingungen angestellten Versuche haben dennoch bewiesen, dass die bakteriostatischen Eigenschaften der Sulfanilamide sich auch im Kaninchenblut offenbaren, allerdings ist die Wirkung hier nicht so anhaltend wie im Menschenblute. So fand z. B. *Schmith*,<sup>328</sup> dass in dem mit Pneumokokken beimpften, 1:5.000 Sulfapyridin enthaltenden Kaninchenserum, — dessen bestimmte Menge zu Anfang des Versuches 41 Kokken enthielt, — die Kokken sich langsamer vermehrten als in den Kontrollkulturen. In der Aussaat der sulfanilamidhaltigen Röhre entwickelten sich selbst in der 12. Stunde bloss 762 Kolonien. Von nun an nahm aber die Zahl der Kokken rapid zu. Dagegen waren in der Kontrollkultur, die nur Serum enthielt, schon in der 4. Stunde 2.000 Kokken vorhanden; ihre Zahl

nahm schon zu, dieser Zeit mächtig zu, und von der 6. Stunde an konnten die Keime nicht mehr gezählt werden. In einem mit Menschenserum unter vollkommen identischen Bedingungen ausgeführten Versuch wiesen die Kokken in den sulfapyridinhaltigen Kulturen anfangs eine geringfügige, vorübergehende Entwicklung auf, bald aber nahm ihre Zahl ab, und nach 14 Stunden konnte in der Kultur kein einziger lebender Coccus mehr nachgewiesen werden. Andere Versuche sprechen dafür, dass das Sulfanilamid unter gewissen Umständen auch im Mäuseblut bakteriostatisch wirkt. *Fuller, Colebrook* und *Maxted*<sup>118</sup> fanden im Mäuseblut verschiedene bakteriostatische Wirkungen des Sulfanilamid je nachdem, ob die Wirkung im defibrinierten, Heparinblut, Plasma oder Serum untersucht wurde. Im Serum und im Heparinblut wirkte 10 mg % Sulfanilamid schon bakteriostatisch, dagegen war diese Konzentration im defibrinierten Blut unwirksam. Zur Erklärung dieser Unterschiede nehmen die Verfasser einen Stoff des Mäuseorganismus an, der die Sulfanilamidwirkung hemme. Wenn nun die Reagenzglasversuche in Abhängigkeit von der Art der Blutgewinnung solche Unterschiede aufweisen, wird mit Recht die Frage erhoben, ob aus diesen Versuchen Rückschlüsse auf die im Organismus herrschenden Verhältnisse überhaupt zulässig sind, zumal dieser hochgradigen Beeinflussung der Reagenzglasversuche vielleicht ein im Laufe der Blutentnahme entstehendes Kunstprodukt zugrunde liegen kann.

Es sind daher diese im allgemeinen negativ ausgefallenen Versuche erheblich weniger beachtenswert als jene, welche die bakteriostatische Wirkung des Sulfanilamid im Mäuse- und Kaninchenorganismus unmittelbar bewiesen haben. *Domagk*<sup>76</sup> beobachtete bei der Untersuchung der Bauchhöhle von Mäusen, die mit Streptokokken intraperitoneal infiziert und zum Teil behandelt wurden, schon nach wenigen Stunden erhebliche Unterschiede zwischen den behandelten und den Kontrolltieren. Bei den Kontrollen kam es in kurzer Zeit zu einer mächtigen Vermehrung der Kokken, während bei den behandelten die Zahl der Keime rasch abnahm, so dass im Exsudat von der 8. Stunde an Kokken nur vereinzelt gefunden wurden. Diese grundlegende Beobachtung *Domagks* wurde seitdem von zahlreichen Verfassern, besonders in bezug auf die Strepto- und Pneumokokkeninfektion der Maus, bestätigt und durch mehrere Beobachtungen ergänzt. 1937 teilten *Long* und *Bliss*<sup>232</sup> mit, dass die Streptokokken aus der Bauchhöhle der behandelten Mäuse bald verschwinden, obwohl sie vor ihrem Schwund noch zu einer vorübergehenden Bakteriämie Anlass geben können. *MacIntosh* und *Whitby*,<sup>240</sup> *Reid*,<sup>310</sup> ferner *Schmith*<sup>328</sup> haben festgestellt, dass die Kokken, trotz der Behandlung, eine Zeit lang nach der Infektion noch ein wenig gedeihen und ihre Zahl erst nach 6 Stunden rasch abzunehmen beginnt. Sonach kann es im Frühstadium der Infektion zu einer gewissen Generalisation kommen; im Blute können Bakterien erscheinen. Die Bakteriämie ist aber vorübergehend, und nach 24 Stunden lassen sich Kokken sowohl im Blute als auch an der Stelle der Infektion nur spärlich finden. *Demnach hört die Vermehrung der Bakterien im lebenden Organismus gleich wie in dem Reagenzglas erst nach einer Latenzperiode auf.* Dieser Parallelismus dürfte in dem Sinne ausgewertet werden, dass die in Reagenzglasversuchen beobachtete

bakteriostatische Wirkung der Sulfanilamide auch im lebenden Organismus zur Geltung kommt. Obwohl die Erreger aus Blut und Exsudat rasch verschwinden, kann der Organismus noch nicht als sterilisiert angesehen werden; *Levaditi* und *Vaisman*<sup>216</sup> fanden selbst noch am 8. Tage nach der Infektion Streptokokken in den parenchimatösen Organen der Maus (s. auch Kap. II).

Ebenso wie die grampositiven Kokken verschwinden auch die in Mucin suspendierten Meningokokken unter der Einwirkung der Behandlung aus der Bauchhöhle der infizierten Mäuse (*Ivánovics*<sup>158</sup>).

Die mit 1.000 tödlichen Dosen infizierten Mäuse wurden sofort nach der Infektion mit einer einmaligen grossen Sulfamethylthiazoldosis (30 mg) per os behandelt, in zweistündigen Abständen zu dritt getötet und ihre Organe, vor allem das Bauchfellexsudat, bakteriologisch untersucht. Parallel zu diesen wurden auch Kontrolltiere eingestellt, die kein Medikament erhielten. In der Bauchhöhle der nach 2 Stunden getöteten Tiere waren Kokken bei den behandelten und unbehandelten gleichweise spärlich zu finden. Nach 4 Stunden war der Unterschied schon beträchtlich: in der Bauchhöhle der behandelten Mäuse war die Zahl der Kokken ungefähr die gleiche wie bei den nach zwei Stunden getöteten, bei den unbehandelten liess sich aber ihre wesentliche Vermehrung feststellen. Bis zu diesem Zeitpunkt konnten die Kokken im Herzblut aller getöteten Tiere nachgewiesen werden. Nach 6 Stunden war die Zahl der Keime in der Bauchhöhle der unbehandelten Tiere ansehnlich, während ihre Anwesenheit mikroskopisch nur bei 2 von 3 behandelten Tieren beobachtet werden konnte; die Züchtung gelang aber in allen drei Fällen. Im Herzblut wurden Kokken nur bei jenen zwei Tieren festgestellt, bei denen auch der mikroskopische Befund des Bauchexsudates positiv war. Nach 8 Stunden fanden wir nur bei 1 Tier Kokken, während ihre Zahl bei den Kontrollen weiter anstieg. Nach 10–12 Stunden waren Blut, Exsudat, Milz, Leber und andere Organe der behandelten Mäuse keimfrei, während bei der Kontrollen der ganze Organismus von ihnen überschwemmt war.

Ähnliche Beobachtungen machten bei Kaninchen *Gay* und *Clark*.<sup>122</sup> Sie haben die Tiere mit Streptokokken intrapleural infiziert und mit Sulfanilamid behandelt, dann den Infektionsverlauf bzw. die Generalisierung in serienweisen Untersuchungen verfolgt. Bei den behandelten Tieren erreichte die Zahl der Erreger in den ersten 12 Stunden das Zehnfache des ursprünglichen Wertes. Hingegen wurde bei den Kontrollen eine 6.500-fache Vermehrung beobachtet. Im weiteren nahm die Zahl der Kokken bei den behandelten Tieren nicht mehr zu, im Gegenteil, es fand eine Abnahme statt. Im Verlauf der Behandlung war auch die Generalisierung der Infektion nur geringfügig und von vorübergehendem Charakter. In der nichtinfizierten Pleurahöhle der anderen Seite und im Blut waren die Kokken nur kurze Zeit und in kleiner Zahl vorhanden.

*Vom Gesichtspunkte dieses Problems ist es eine sehr wichtige Tatsache, dass die p-Aminobenzoesäure auch die therapeutische Wirkung der Sulfanilamidderivate behebt. Dies ist ein unwiderlegbarer Beweis dafür, dass diese Verbindungen auch im lebenden Organismus infolge ihrer bakteriostatischen Eigenschaften wirken.* Folgende Versuchsdaten sollen in diesem Zusammenhang besprochen werden. *Selbie*<sup>336</sup> verabreichte mit hämolytischen Streptokokken infizierten Mäusen je 25 mg Sulfanilamid und p-Aminobenzoesäure. Der Unterschied war im Vergleich mit der nur mit Sulfanilamid behandelten Gruppe sehr auffallend. Diese Beobachtung wurde auch von *McCarty*,<sup>239</sup> *Strauss*, *Lowell* und *Finland*,<sup>351</sup> *Martin* und *Fischer*,<sup>263</sup>

*Benigno*,<sup>16</sup> ferner *Domagk*<sup>60</sup> auf Grund von Versuchen mit verschiedenen Sulfanilamidderivaten bestätigt. *Domagk* beobachtete überdies, dass die therapeutische Wirkung des „Amonal“ ( $\text{NO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{COO} \cdot \text{C}_{12}\text{H}_{25}$ ) gegen Pneumokokken durch die p-Aminobenzoesäure nicht aufgehoben wird.

Anlässlich der In-vivo-Versuche mit der p-Aminobenzoesäure-Interferenz ist es aber aufgefallen, dass die *In-vivo-Wirkung* dieser Säure erheblich grössere Mengen erfordert, als im Reagenzrohr. *Martin* und *Fischer*<sup>263</sup> konnten die therapeutische Wirkung von 2 mg Sulfanilamid erst mit 0,8 mg p-Aminobenzoesäure neutralisieren; im Reagenzglas genügen cca 0,002 mg (*McIlwain*<sup>242</sup>). Seiner Ansicht nach sei dieser Unterschied zum Teil dadurch bedingt, dass die p-Aminobenzoesäure im Organismus grösstenteils rasch acetyliert und auf diese Weise wirkungslos bleibe, zum Teil dadurch, dass die freie Säure den Organismus schneller als das Sulfanilamid verlasse. *McIlwain*<sup>242</sup> legt dieser Auffassung die Untersuchungen von *Harrow*, *Mazur* und *Sherwin*,<sup>142</sup> ferner *Quick*<sup>302</sup> über die Resorption und Ausscheidung der p-Aminobenzoesäure zugrunde. Obwohl im Laufe unserer Ausführungen die klinischen Beobachtungen immer ausser acht gelassen wurden, möchten wir hier ausnahmsweise erwähnen, dass *Kimmig*<sup>186</sup> die Globucid-Therapie der Gonorrhöe für unwirksam fand, wenn er dem Kranken gleichzeitig auch p-Aminobenzoesäure verabreichte. Allerdings wurden seine Beobachtungen von *Loehe* und *Brett*<sup>238</sup> nicht bestätigt.

Nach dem Gesagten steht es zweifelsohne fest, dass der p-Aminobenzoesäure-Interferenz auch beim lebenden Organismus Rechnung zu tragen ist. Dass dieser zum  $\text{B}_2$ -Komplex gehörende Stoff auch in den höheren Organismen anwesend ist, kann kaum bezweifelt werden, obwohl er aus tierischen Organen noch nicht isoliert wurde. Dennoch stehen schon Angaben hinsichtlich seiner Menge zur Verfügung. Von den einschlägigen Versuchen dürfte denen von *MacLeod*<sup>252</sup> kaum ein restloses Vertrauen entgegengebracht werden, da seine Ergebnisse infolge seiner Versuchsmethodik auch von unspezifischen Faktoren beeinflusst werden konnten. *MacLeod* stellte nämlich seine Versuche mit sulfanilamidvergifteten Coli-Kulturen an. In synthetischen Nährböden können nun ausser der p-Aminobenzoesäure auch andere Stoffe (z. B. Methionin), zu einer Interferenz Anlass geben (s. auch IV. Kap. Pt. 3.). Nach *MacLeod* üben die Exsudate und Punktate, der menschliche Urin und die Extrakte — besonders die Autolysate — der tierischen Organe eine Antisulfanilamidwirkung aus. *McIlwain*<sup>242</sup> verwendete zum Nachweis der p-Aminobenzoesäure die Kulturen des *Cl. acetobutylicum*. Das Verfahren hat sich zum spezifischen Nachweis dieser Substanz bewährt. Er fand mit dieser Methode im menschlichen Plasma  $2-10 \times 10^{-9}$  mol, in den roten Blutkörperchen  $5-8 \times 10^{-9}$  mol, im Urin  $5-20 \times 10^{-9}$  mol freie p-Aminobenzoesäure. Die Menge der nach Hydrolyse freiwerdenden p-Aminobenzoesäure ist erheblich grösser: im Plasma  $120-1.200 \times 10^{-9}$  mol, im Urin  $500-20.000 \times 10^{-9}$  mol. Seiner Ansicht nach benötige der Organismus bei Vorhandensein von freier p-Aminobenzoesäure in einer Konzentration von  $2-10 \times 10^{-9}$  mol eine Sulfanilamidkonzentration von  $10^{-4}-10^{-5}$  mol, um die Vermehrung der hämolytischen Streptokokken zu ver-

hindern. Dieser Wert stimmt mit den empirisch gewonnenen gut überein, denn die minimale Sulfanilamidkonzentration, die noch therapeutisch wirksam ist, beträgt  $1,2 \times 10^{-4}$  mol ( $\approx 2$  mg %). Ähnliche Studien können, besonders in pathologischen Fällen, zu praktisch wichtigen Feststellungen führen, zumal aus den Versuchen *Mac Leods*, obwohl sie nicht beweiskräftig sind, darauf geschlossen werden kann, dass die zerstörten bzw. durch Autolyse zugrunde gegangenen Gewebe eine gesteigerte Menge von p-Aminobenzoesäure enthalten, weshalb die von *McIlwain* angegebene kritische Konzentration am Ort der pathologischen Veränderungen als unzureichend zu betrachten wäre.

## 2. Die Rolle der Abwehrreaktionen des Organismus.

Solange die Verwandlung des Prontosil im Organismus nicht bekannt und die bakteriostatische Wirksamkeit des Sulfanilamid nicht generell anerkannt war, glaubten viele, dass die Sulfanilamide ihre Wirkung auf die Krankheitserreger nicht direkt, sondern auf dem Umwege über die Abwehrreaktionen des Organismus ausübten. Vor allem wurde angenommen, dass die Vernichtung der Erreger durch Förderung der Tätigkeit des reticuloendothelialen Systems (RES) erfolge. Im Jahre 1935 fand *Domagk*<sup>74, 76</sup> in der Bauchhöhle der mit Streptokokken intraperitoneal infizierten Maus neben zahlreichen Kokken nur Leukozytenfragmente, während im Exsudat der mit Prontosil behandelten Tiere keine Kokken, hingegen wohlerhaltene Leukozyten vorhanden waren. Auf Grund dieser Erfahrungen behauptete *Domagk*<sup>75</sup> ein Jahr später, dass im Organismus der mit Prontosil behandelten Tiere die Phagozytose gesteigert werde und hiermit die günstige Wirkung des Präparates zusammenhänge. Das Prontosil wirke demnach „opsonisierend“ auf die Bakterien. Über ähnliche Beobachtungen berichteten damals auch *Levaditi* und *Vaisman*<sup>218</sup>. *Long* und *Bliss*<sup>232</sup> legten 1937 ebenfalls die gesteigerte Phagozytose der therapeutischen Wirkung zugrunde. Später (1937) äusserte sich *Domagk*<sup>77</sup> dahingehend, dass die erhöhte Phagozytose bzw. ihre Rolle nicht genügend bewiesen werden konnte. Auch *Bliss* und *Long*<sup>25</sup> gingen später von ihrer ursprünglichen Ansicht ab, bzw. behaupteten, die Phagozytose komme beim behandelten Tier darum besser zur Geltung, weil das Arzneimittel das Wachstum der Streptokokken verlangsamt, wodurch sich den Leukozyten zur Entfaltung ihrer Tätigkeit mehr Möglichkeit biete als in den Kontrollen.

Die therapeutische Bedeutung der gesteigerten Phagozytose wurde auch von anderen Verfassern (*Mellon*<sup>248, 271</sup> und seine Mitarbeiter, *Reid*<sup>310</sup> ferner *Schmith*<sup>328</sup>) als unbewiesen betrachtet; in der Bauchhöhle der behandelten und der unbehandelten Tiere sind gleichweise wenig Leukozyten vorhanden, auch diese haben nur eine kleine Anzahl von Kokken einverleibt. Nach *Mellon* und seinen Mitarbeitern werde die Tätigkeit der reticuloendothelialen Zellen der Milz und Leber durch das Sulfanilamid nicht erhöht. *Gay* und *Clark*<sup>122</sup> äussern sich hierüber auf Grund ihrer Kaninchenversuche wie folgt (1937): „...sulfanilamide apparently produces a bacteriostasis sufficiently marked to protect the accumulated leucocytes and to allow the natural defence macrophages to accumulate. There is direct evidence



that the drug does not itself stimulate mobilization of the macrophages. There is no evidence that the cell reaction which finally accounts for disposal of the organisms is other than local." *Bosse*<sup>31</sup> hat zwar behauptet (1936), dass das Prontosil bei splenektomierten Mäusen schwächer wirke, doch wurde dies von anderen Forschern (*Mellon*<sup>134, 272</sup> und seine Mitarbeiter, *Mac Intosh* und *Whitby*<sup>246</sup>) nicht bestätigt, so dass bezüglich der primären Wirkung des Sulfanilamid auf das RES keinerlei Beweis erbracht wurde. Interessant sind in dieser Beziehung die bisher noch nicht erhärteten Beobachtungen von *Finklestone-Sayliss*<sup>98</sup> und seine Mitarbeiter, die im Laufe einer anhaltenden Sulfanilamidwirkung die Vermehrung der Milzphagozyten festgestellt haben.

Wie ersichtlich, konnte die phagozytosefördernde Wirkung der Sulfanilamide in vivo nicht bewiesen werden. Es gibt aber Beobachtungen, die dafür sprechen, dass das Prontosil bzw. Sulfanilamid in vitro die Phagozytose der Leukozyten steigert. Diese Wirkung kommt bei grossen Verdünnungen der Präparate zur Geltung (*Finkelstein* und *Birkeland*<sup>97</sup>, *Chandler* und *Janeway*<sup>53</sup>). *Miss Tunnicliff*<sup>363</sup> hat in zahlreichen ausführlichen Versuchen erwiesen, dass die Leukozyten des menschlichen Zitratblutes nach Hinzufügung von 1:100.000 Prontosil den *Streptococcus viridans* energischer phagozytieren. Ferner beobachtete sie, dass die aus Otitiseiter und Zahngranulomen entnommenen Leukozyten unter der Wirkung von starken Verdünnungen dieser Mittel die Kokken in erhöhtem Masse einverleibten. Auch in Knochenmarkkulturen beobachteten *Osgood* und *Browlee*<sup>284</sup> eine gesteigerte Phagozytose, wenn sie mit Sulfanilamid versetzt wurden. Doch sei dies nach der Meinung der Verfasser nicht als eine direkte Sulfanilamidwirkung anzusehen; die Erscheinung komme in der Weise zustande, dass die der Sulfanilamidwirkung ausgesetzten Kokken weniger Toxin (Leukocidin) erzeugen, wodurch die weissen Blutzellen weniger geschädigt werden.

Der von den einzelnen Verfassern beobachteten in vitro gesteigerten Phagozytose scheint vom Gesichtspunkt der therapeutischen Wirksamkeit aus keine besondere Bedeutung zuzukommen. Dieser Ansicht haben sich auf Grund ihrer eigenen Beobachtungen auch *Chandler* und *Janeway*<sup>53</sup> angeschlossen. *Warscheinlich stellt diese Wirkung eine nichtspezifische Eigenschaft dieser Mittel dar.* In diesem Sinne lassen sich auch die unlängst veröffentlichten Versuche von *Neufeld* und *Baer*<sup>284</sup> auswerten. Sie behaupten, dass die in vitro zu beobachtende gesteigerte Phagozytose nicht durch das Sulfanilamid, sondern durch ein näher nicht bekanntes labiles Verwandlungsprodukt des Sulfanilamid hervorgerufen werde. In ihren Versuchen wurde nämlich die Steigerung der Phagozytose nur dann beobachtet, wenn das Sulfanilamid vorher eine längere Zeit hindurch mit dem Blut in Berührung war. Sie glauben, dass der opsonisierend wirkende Stoff — der sehr labil sein dürfte, da die Versuche bei systematischer Wiederholung nicht immer gelangen — während der Berührung des Mittels mit dem Blut entstehe. Sie sagen hierüber folgendes: „Bisweilen, wohl infolge der Labilität des wirksamen Produkts, misslingt aber der Nachweis der Phagozytoseförderung. Ferner gelang uns noch nicht ein reproduzierbar eindeutiger Nachweis einer phagozytoseerregenden Wirkung von Eubasin (Sulfapyridin) gegen-

über Pneumokokken nach Umwandlung in Tierkörper oder in vitro.“ Ähnlich äussern sie sich über das Uliron und auch das Albucid. Die Specificität der von ihnen beobachteten Erscheinungen ist aber sehr zweifelhaft, da die Phagozytose in den Kontrollversuchen auch von Tannin, Eisenaulan usw. gefördert wurde.

Was nun die Bedeutung der Phagositose für die Sulfanilamidwirkung betrifft, ist hierüber zusammenfassend folgendes zu sagen: *Das Sulfanilamid wirkt primär auf die Bakterien, diese Wirkung hat die Abnahme ihrer Fortpflanzungsfähigkeit und Toxinerzeugung zur Folge, wodurch das RES seiner Aufgabe, der Entfernung der eindringenden Keime, leichter gerecht werden kann.* Ist die Vermehrungsfähigkeit ein Massstab der Virulenz, so ist die Lage der unter Sulfanilamidwirkung stehenden Bakterien im Organismus dieselbe wie die der avirulenten Keime, sie fallen der Abwehrtätigkeit des Organismus zum Opfer. Ausser diesen cellulären Faktoren sind an der Heilung auch andere, die Immunstoffe, beteiligt. Die Bedeutung des humoralen Faktors wurde schon im Kap. II. erörtert, deshalb soll hier nur darauf verwiesen werden. Bestimmt wird die Immunstoffproduktion durch die Sulfanilamide nicht gesteigert (*Curnen* und *MacLeod*<sup>67</sup>), aber, wie erwähnt, auch nicht gehemmt. Mithin ist den Immunstoffen in der Sulfanilamidbehandlung eine gewisse Bedeutung beizumessen.

Als eine weitere Folge der durch die Sulfanilamide bedingten Bakteriostase ist der Umstand zu beachten, dass parallel zur Abnahme der Entwicklung auch die Toxinproduktion abnimmt. Wie bereits erwähnt, konnten *Osgood* und *Browlee*<sup>294</sup> (1938) die Abschwächung der Hämotoxinproduktion der Streptokokken unter Sulfanilamidwirkung beobachten. Über die Abnahme der Hämotoxin- und Fibrinolysinerzeugung berichteten schon früher *Madison* und *Snow*<sup>254</sup>, später *Huntington*<sup>152</sup>; *Neter*<sup>283</sup> fand im Punktat der mit Sulfanilamid behandelten Empyemfälle weniger Fibrinolysin, als in den unbehandelten Fällen. *Es ist hingegen fraglich, ob das Sulfanilamid die Giftwirkung des fertigen Toxins herabzusetzen vermag*, wie es von *Levaditi* und *Vaisman*<sup>217</sup> behauptet wurde (1935). Unseres Wissens wurde diese Beobachtung nur von *Carpenter*<sup>48, 49, 50, 51</sup> und seinen Mitarbeitern bestätigt. Letztere fanden in zahlreichen Tierversuchen, dass die Endotoxine der Gono-, Pneumo- und Staphylokokken bzw. die Toxine des *Cl. botulinum*, *Bac. tetani* und anderer Anaerobier in der Menge von 1—2 d. i. m. von Sulfanilamid in vitro oder in vivo oder in beiden Fällen inaktiviert werden. Andere Verfasser aber sprechen den Sulfanilamiden jede toxinneutralisierende Fähigkeit ab. In diesem Sinne berichten: *Huntington*<sup>152</sup> über das erythrogene Toxin der Streptokokken; *Osgood* und *Powell*<sup>295</sup> über die Hämotoxine des *Staphylococcus*, *B. perfringens*, *B. tetani*, *B. oedematis maligni*. Ebenso wenig konnten sie den Einfluss der Sulfanilamide auf das Diphtherie- oder Tetanustoxin feststellen, *Gross*, *Cooper* und *Lewis*<sup>133</sup> konnten die Wirkung des Meningococcusendotoxins mit Sulfanilamid nicht abwehren. Schliesslich seien die misslungenen Versuche *Schneiersons*<sup>329</sup> erwähnt, der mit Sulfanilamid das Schwarzmanssche Phänomen beeinflussen wollte.

### 3. Quantitative Zusammenhänge zwischen der In-vivo- und In-vitro-Wirkung.

Auf Grund der gegenwärtigen Kenntnisse steht es zweifelsohne fest, dass die therapeutische Wirkung der Sulfanilamidderivate auf ihrer bakteriostatischen Wirkung fusst. Die Verbindungen wirken im Organismus unmittelbar auf die Erreger; hierdurch gewähren sie dem Organismus Zeit und Hilfe zur Entfaltung seiner natürlichen Abwehrreaktionen. Wenn nun der therapeutischen Wirksamkeit die bakteriostatische Wirkung zugrunde liegt, so wäre anzunehmen, dass die beiden Werte sich parallel zu einander verhalten. Wie im folgenden gezeigt werden soll, trifft das nicht ganz zu, und der Parallelismus kann nur als partiell betrachtet werden.

Bedauerlicherweise ist die Zahl der einwandfreien Versuche, die für die Lösung dieses Problems in Betracht kommen, ziemlich gering. Da es sich um quantitative Verhältnisse handelt, sind die Fehlerquellen zahlreich. In einer Hinsicht sind aber die Literaturangaben übereinstimmend und verlässlich: *es gibt kein strenger Parallelismus zwischen therapeutischer und bakteriostatischer In-vitro-Wirkung.*

Vom Gesichtspunkt der Frage aus schien die Ausserachtlassung der N<sup>4</sup>-Derivate (Prontosil, entsprechende Acylderivate des Sulfanilamid usw.) zweckmässig zu sein, da diese Verbindungen — wie im Kap. V. bereits erwähnt wurde — im Reagenzglas vollkommen unwirksam sind und im Organismus nur in dem Grade wirken, wie sie zu Sulfanilamid gespalten werden. Dennoch sind einige von ihnen therapeutisch sehr wirksam; so ist das in vitro unwirksame Diacetyl-derivat des 4,4'-Diaminodiphenylsulfon ( $\text{CH}_3 \cdot \text{CO} \cdot \text{HN} \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{SO}_2 \cdot \text{C}_6\text{H}_4 \cdot \text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ ) bei der Streptokokkensepsis der Mäuse dem Sulfanilamid nach *Bauer* und *Rosenthal*<sup>13</sup> dreifach, nach *Buttle*<sup>40</sup> und seinen Mitarbeitern zehnfach überlegen. Der Umstand, dass die N<sup>4</sup>-Derivate im Organismus wirksam werden, macht das Problem noch verwickelter. So liegt es im Interesse der Vereinfachung der Probleme, von diesen Verbindungen hier abzusehen.

In Zusammenhang mit der bakteriostatischen Wirkung der Sulfanilamide wurde weiter oben erwähnt, dass die einzelnen Verbindungen gegenüber den verschiedenen Erregern *verhältnismässig ungefähr* gleich wirksam sind. So sind z. B. die heterozyklischen Sulfanilamidderivate gegen Pneumokokken, Streptokokken, Coli-, Ruhr- und Typhusbazillen erheblich, oft 10—20-mal wirksamer als das Sulfanilamid. Wäre die therapeutische Wirkung nur durch die bakteriostatische Wirksamkeit bestimmt, so müssten die heterozyklischen Derivate gegen alle Infektionen beträchtlich wirksamer sein als das Sulfanilamid. Es steht aber fest, dass dem nicht so ist.

Auch die klinischen Erfahrungen, die hier übrigens nicht behandelt werden sollen, weisen darauf hin, dass bei den verschiedenen Infektionen von den einzelnen Verbindungen verschiedene therapeutische Wirkungen zu erwarten sind. Die Erfahrungen der experimentellen Chemotherapie gestatten selbstverständlich eine sicherere Beurteilung dieser Verhältnisse als die klinischen Beobachtungen; die Existenz solcher Unterschiede ist aber ohnedies nicht zu bezweifeln. Das Sulfapyridin, Sulfathiazol, Sulfamethylthiazol und

andere heterozyklische Derivate wirken bei der *Pneumokokkeninfektion der Mäuse energischer als das Sulfanilamid*. Berücksichtigt man auch die Unterschiede der Molekülgrösse, so ist ihre Wirksamkeit 3—4-mal höher als die des Sulfanilamid zu schätzen (s. Kap. II.). *Marshall*<sup>223</sup> und seine Mitarbeiter stellten in bezug auf die Wirksamkeit der Verbindungen gegen die Infektion der Maus mit *Pneumococcus* Typ 1 folgende Verhältniszahlen fest: Sulfapyridin 1 (die Einheit), Sulfathiazol 1,2; Sulfanilamid 0,45; Sulfon 5—8. Demnach wirke das Sulfathiazolmolekül in vivo 5,2-mal, das Sulfapyridin 4,3-mal, das Sulfon 16—25-mal stärker als das Sulfanilamidmolekül. Im Reagenzglas (*Frisk*<sup>112</sup>) wirkt das Sulfapyridin 5-mal, das Sulfathiazol 25-mal, das Sulfamethylthiazol 5—25 mal so stark auf den *Pneumococcus*, wie das Sulfanilamid. *Jensen* und *Schmith*<sup>178</sup> fanden, dass das 4,4'-Diaminodiphenylsulfon, das Sulfathiazol und Sulfamethylthiazol in der 1:160.000 Verdünnung, das Sulfapyridin in der 1:40.000, das Sulfanilamid in der 1:5.000—1:10.000 Verdünnung auf den *Pneumococcus* Typ 1 bakteriostatisch wirkte. Sonach sind Sulfathiazol, Sulfapyridin und Sulfon dem Sulfanilamid in vivo und in vitro überlegen, diese zwei Wirkungen verhalten sich aber nicht streng parallel: *denn das Sulfon ist viel wirksamer in vivo, als die heterozyklischen Derivate, obwohl sie in vitro keinen Unterschied zeigen.*

*Die heterozyklischen Derivate wirken auch gegen die Streptokokken stärker bakteriostatisch als das Sulfanilamid, in vivo sind aber die Präparate gleich wirksam.* Tabelle 26. enthält die Daten der bakteriostatischen Versuche mit einem *Streptococcus hemolyticus*-Stamm Gruppe B, in deren Verlaufe die mäusetherapeutische Wirkung der Präparate verglichen wurde. Die Antistreptokokkenwirkung der einzelnen Mittel wurde auf Grund der Literaturangaben aufgezeichnet. Die bakteriostatische Wirkung wurde in Caseinnährboden auf Grund der in Kap. III. besprochenen Methode gemessen. Der Titer bedeutet die grösste Verdünnung, die im Falle eines 10<sup>-6</sup> ccm Inoculums die Gedeihung der Kokken in dem 24stündigen Versuch gerade verhinderte.

Wir sind uns darüber klar, dass die in der Tabelle verzeichneten Literaturdaten nur für Orientierungszwecke geeignet sind, da die Untersuchungen mit verschiedenen Stämmen unter Anwendung verschiedener Methoden durchgeführt wurden. Obwohl die Ergebnisse aus diesem Grunde ziemlich heterogen sind, gestatten sie doch von mehreren Gesichtspunkten aus eine Einsicht in das Problem. So lässt sich z. B. feststellen, was weiter oben bereits erwähnt wurde, dass gegen die *Streptococcus*infektion der Maus die heterozyklischen Derivate nicht oder kaum wirksamer sind als das Sulfanilamid. Ansonst sprechen alle Versuche eindeutig dafür, dass das 4,4'-Diaminodiphenylsulfon erheblich energischer wirkt als das Sulfanilamid; es erwies sich in den Versuchen von *Bauer* und *Rosenthal*<sup>13</sup> dem Sulfanilamid dreissigfach, in denen von *Buttle*<sup>40</sup> und seinen Mitarbeitern hundertfach überlegen. *Marshall*<sup>262</sup> und seine Mitarbeiter haben festgestellt, dass zur Heilung der mit Streptokokken infizierten Maus aus dem Sulfanilamid eine dreifache Blutkonzentration erforderlich sei, gegenüber dem Sulfon.

Aus obigen geht klar hervor, dass die heterozyklischen Sulf-

Tabelle 26.

*Die bakterio statische Wirkung von verschiedenen Sulfanilamidderivaten auf den Streptococcus (Gruppe B) und ihre Antistreptococcus-Wirkung in der Maus nach Literaturangaben.*

| Verbindung                             | Baktsts.-Titer | Antistrep.-Wirk. in Maus                           |
|--|----------------|--|
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-nitroanilid      | mol/332.000    | ++++ <sup>11</sup>                                 |
| 2-Sulfanilamido-4-methylthiazol        | mol/290.000    | ++++ <sup>62</sup> , +++ <sup>100</sup>            |
| 4,4'-Diaminodiphenylsulfon             | mol/145.000    | +++++ <sup>12,13,40,44 107,262</sup>               |
| 2-Sulfanilamido-pyridin                | mol/82.000     | ++++ <sup>62,378</sup> , +++ <sup>78,100,262</sup> |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-aminoanilid      | mol/58.000     | ++++ <sup>11,377</sup>                             |
| 4-Aminobenzolsulfo-2'-carboxyanilid    | mol/47.000     | +++ <sup>65</sup>                                  |
| 4-Aminobenzolsulfo-anilid              | mol/45.000     | +++ <sup>41</sup> , ++ <sup>13</sup>               |
| 4-Aminobenzolsulfonamid (Sulfanilamid) | mol/22.000     | +++  |
| 4-Aminobenzolsulfo-3'-carboxyanilid    | mol/18.000     | + <sup>65</sup>                                    |
| Sulfaguandin                           | mol/13.000     | ++ <sup>261</sup>                                  |
| 4-Aminobenzolsulfo-4'-carboxyanilid    | mol/6.200      | + <sup>11,12,13</sup>                              |
| Sulfanilsäure                          | mol/3.900      | + <sup>41</sup> , — <sup>362</sup>                 |
| 4-Aminobenzolsulfoaminoessigsäure      | mol/1.430      | + <sup>11,40</sup>                                 |
| Marfanil                               | mol/1.000      | + oder ++ <sup>80</sup> , + <sup>167</sup>         |
| 4,4'-Dioxydiphenylsulfon               | mol/1.000      | — <sup>40</sup>                                    |
| 4-Aminobenzamid                        | > mol/500      | — <sup>362</sup>                                   |
| 4-Nitrobenzoesäure                     | > mol/500      | ++ <sup>269</sup> , + <sup>316</sup>               |
| 4-Nitrobenzamid                        | > mol/500      | + <sup>316</sup>                                   |

Bemerkung zur Tabelle: Die chemotherapeutische Wirksamkeit wird durch folgende Zeichen angegeben: + = das Mittel ist kaum wirksam, ++ = es wirkt etwas schwächer als das Sulfanilamid, +++ = gleichwertig mit dem Sulfanilamid, ++++ = wirkt besser, höchstens zweimal so stark wie das Sulfanilamid, +++++ = mindestens dreimal so stark wie das Sulfanilamid.

Bemerkung zu den in der Tabelle angeführten Literaturangaben. (80): Domagk schreibt auf Seite 69 seiner Arbeit: „Marfanil, das in vitro gegen Streptokokken besonders gut wirksame Sulfanilamid, wirkt bei oraler Darreichung auf die mit Streptokokken infizierte Maus geringer als P. A.“. (167): Die Infektion erfolgte mit Richard-Stamm ip. ( $0,5 \cdot 10^{-7}$  ccm Bouillonkultur). Insgesamt 6 Behandlungen wurden durchgeführt mit je  $2 \times 5$  mg täglich. Fünf Kontrolltiere gingen innerhalb von 24 Stunden ein. Von den mit Marfanil behandelten 6 Tieren blieb 1 am Leben, die 5 eingegangenen lebten durchschnittlich 1,2 Tage.

anilamidderivate gegen die Streptokokkeninfektion der Maus nicht besser wirken als das Sulfanilamid selbst. Dagegen sind die Derivate dem Sulfanilamid bei den Pneumococcusinfektionen mehrfach überlegen. Eigentümlicherweise wirkt das Sulfon in beiden Fällen energischer als die anderen Präparate. Es hat den Anschein, dass die heterozyklischen Derivate nicht nur gegen die Streptokokken sondern auch bei anderen Infektionen das Sulfanilamid an Wirkung nicht immer übertreffen. Bei der intraperitonealen Typhusinfektion der Maus wirkten Sulfathiazol und Sulfapyridin nicht besser als das Sulfanilamid, obwohl sie im Reagenzglas erheblich wirksamer waren (Ivánovics<sup>167</sup>). Andererseits wirkt das Sulfathiazol und noch mehr das

Sulfamethylthiazol auf die Staphylococcusinfektionen bekanntlich besser als das Sulfapyridin oder das Sulfanilamid.

*White, Litchfield* und *Marshall*<sup>381</sup> stellten bei der Coliinfektion der Mäuse für die Wirksamkeit der einzelnen Präparate folgende Verhältniszahlen fest (die Wirkung des Sulfanilamid wird mit 1 bezeichnet): Sulfapyridin 6, Sulfathiazol 10, Sulfadiazin 11. In vitro war das Sulfapyridin 16-mal, das Thiazol und das Diazin 64-mal wirksamer. Gewisse Zusammenhänge konnte *Frisk*<sup>113</sup> auch in seinen Pneumococcusversuchen finden. Diese Daten führen wir in der Zusammenstellung des Verfassers unten an. Die stärkste Wirkung wird von *Frisk* mit 1 bezeichnet.

| <i>In-vivo-Wirkung</i> |   | <i>In-vitro-Wirkung</i> |   |
|------------------------|---|-------------------------|---|
| Wirksamkeit            | Verbindung                                | Wirksamkeit             | Verbindung                                |
| 1,0                    | Sulfathiazol                              | 1,0                     | Sulfathiazol                              |
|                        | Sulfamethylthiodiazol                     |                         | Sulfamethylthiodiazol                     |
|                        | Sulfapyridin                              |                         | Sulfaisopropylthiodiazol                  |
|                        |   |                         | Sulfapyridin                              |
|                        |   |                         | Sulfaaethylthiodiazol                     |
| 0,8                    | Sulfaaethylthiodiazol                     | 0,2                     | Sulfathiocarbamid                         |
|                        | Sulfacarbamid                             |                         | Sulfathiophen                             |
| 0,5                    | Sulfapyrimidin                            | 0,1—0,2                 | Sulfapyrimidin                            |
|                        | Sulfacarbamid                             |                         | Sulfacarbamid                             |
|                        | N <sup>1</sup> -dimethylacrylsulfanilamid |                         | N <sup>1</sup> -Dimethylacrylsulfanilamid |
|                        | 1-Sulfamethylnaphtalin                    |                         |   |
| 0,25—0,3               | 4-Sulfahydroxymethylnaphtalin             | 0,1                     | 1-Sulfamethylnaphtalin                    |
|                        | Sulfathiophen                             |                         | 4-Sulfahydroxy-methylnaphtalin            |
|                        | Sulfaisopropylthiodiazol                  |                         |   |

Bei Vergleich der zweierlei Wirkungen gibt es nach *Frisk* nur im Falle des Sulfaisopropylthiodiazol und des Sulfathiophen einen auffallenden Unterschied. In bezug auf des erste Präparat bemerkt *Frisk*, dass es im Organismus eine Umwandlung erfahren dürfte (?), während die therapeutische Wertbestimmung des Sulfathiophen mit kaum überwindlichen technischen Schwierigkeiten verbunden ist. Aber es steht fest, selbst wenn diese Ausnahmen unberücksichtigt bleiben, dass die zwei Wirkungsarten nicht immer streng parallel sind.

Die angeführten Beispiele haben bewiesen, dass die bakterio-statische und die therapeutische Wirksamkeit sich nicht immer parallel verhalten. Abhängig von dem Krankheitserreger kann einmal das eine, dann wieder das andere Chemotherapeuticum sich wirksamer erweisen, als es auf Grund der Reagenzglasversuche zu erwarten wäre. Besonders auffallend ist die starke chemotherapeutische Wirksamkeit des 4,4'-Diaminodiphenylsulfon. Auch andere auffallende Unterschiede sind aus Tab. 26. zu ersehen wie z. B. im Falle der 4-Nitrobenzoesäure und des 4-Amino- bzw. 4-Nitrobenzamids. Diese Verbindungen waren in meinen Versuchen gegen den verwendeten *Streptococcus*stamm vollkommen unwirksam. Dagegen hat die p-Nitrobenzoesäure — wie von *Mayer* und *Oechsli*,<sup>209</sup> ferner

*Rosenthal*<sup>316</sup> und seinen Mitarbeitern beobachtet — einen günstigen Einfluss auf die Streptokokkeninfektion der Mäuse.

Die Frage, warum zwischen der In-vivo- und der In-vitro-Wirkung der verschiedenen Sulfanilamide kein strenger Parallelismus besteht, kann auf Grund der gegenwärtigen Kenntnisse nicht definitiv beantwortet werden. Mangels entsprechender Versuche können die Gründe dieser Erscheinung nur vermutet werden. Sicher spielen hier mehrere Faktoren mit. Möglicherweise liegt ein Grund in den pathologischen Eigenschaften der einzelnen Infektionen, obwohl zwischen der Strepto- und Pneumokokkensepsis der Mäuse hinsichtlich des Krankheitsbildes und -verlaufs ein Unterschied ebenso wenig vorliegt wie im Hinblick auf die pathologische Anatomie. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die im lebenden Organismus wachsenden Bakterien gegenüber den Sulfanilamiden entsprechend den einzelnen Präparaten eine von der im Reagenzglas gezeigten abweichende Empfindlichkeit haben. Es gibt ja Erreger (*Streptococcus*, *Milzbrandbacillus*), die im Organismus Kapsel bilden, im Reagenzglas aber selten oder überhaupt nicht. Es ist denkbar, dass die Sulfanilamidderivate durch die Kapsel verschiedentlich diffundieren, wodurch in der therapeutischen Wirkung Unterschiede bedingt sein können. Nicht wenig interessant ist die Tatsache, dass die Milzbrandinfektion der Mäuse durch Sulfanilamidderivate nicht oder nur wenig beeinflusst werden kann (*Ivánovics*,<sup>156</sup> *Cruickshank*,<sup>66</sup> *Máy* und *Buck*<sup>266</sup>), obwohl sie in vitro gegen diese Bazillen eine beträchtliche bakterio-statische Wirkung ausüben (*Ivánovics*<sup>167</sup>). Man soll aber bedenken, dass der *Anthraxbacillus* im Organismus Kapsel trägt und keine Sporen bildet, im Reagenzglas sich aber umgekehrt verhält: das „animale“ Bakterium unterscheidet sich erheblich von dem gezüchteten. Ferner können die therapeutischen und die Reagenzglasversuche auch darum von einander abweichen, weil die verschiedenen Sulfanilamide sich zwischen den Bakterien und den Wirtszellen eigenartig aber verschiedentlich verteilen. Es ist durchaus möglich, dass einzelne in vitro hochwirksame Verbindungen im Organismus darum versagen, weil sie gegenüber der Bakterienzelle geringe Elektivität besitzen und von den Zellen des Wirtes stärker angezogen werden. Auch das Vorhandensein von verschiedenen Stoffen mit Antisulfanilamidwirkung im Organismus — ausser der p-Aminobenzoesäure — ist zu erwägen. Hierüber liegen schon experimentelle Erfahrungen vor; *Martin* und *Fischer*<sup>263</sup> haben gezeigt, dass die therapeutischen Sulfanilamidwirkung vom Adenin ähnlich wie von der p-Aminobenzoesäure vernichtet wird. Merkwürdigerweise bleibt dieser Stoff im Reagenzglas unwirksam.

Die angeführten Möglichkeiten können für den Umstand, dass die In-vivo- und die In-vitro-Versuche nicht immer parallel verlaufen, ausnahmslos von Bedeutung sein. Das ist von der experimentellen Chemotherapie aus gesehen recht bedauerlich, da die kostspieligen und viel Mühe erheischenden Tierversuche nicht durch einfache Reagenzglasversuche ersetzt werden können. Dennoch ist der Wert der In-vitro-Versuche kaum zu unterschätzen, da ihnen bei der Erforschung des Wirkungsmechanismus dieser Verbindungen mindestens dieselbe Bedeutung zukommt wie den Tierexperimenten.

## Das Problem der Sulfanilamidresistenz.

Im Besitz einer entsprechenden Methode zur Untersuchung der bakteriostatischen Wirkung des Sulfanilamid wurde bald festgestellt, dass gegenüber dem Sulfanilamid nicht nur die Streptokokken sondern auch die verschiedenen anderen Bakterien empfindlich sind. Der Enterococcus bildet vielleicht die einzige Ausnahme. Von einzelnen Stämmen dieses Erregers wurde schon 1937 von *Bliss*<sup>26</sup> und *Long* festgestellt, dass seine Entwicklung selbst von einer mehrere Hundert mg % betragenden Sulfanilamidkonzentration nicht verhindert wird. Seitdem hat es sich herausgestellt, dass diese Eigenschaft nicht nur der eine oder andere Stamm sondern die ganze Abart (Streptococcus D) aufweist. Infolge der Sulfanilamidresistenz des Enterococcus wird bei anhaltender und energischer Sulfanilamidbehandlung die ganze Stuhlflora des Menschen oder des Tieres verändert. Die Zahl der empfindlichen laktosefermentierenden Bakterien nimmt hochgradig ab, während die der Enterokokken unverändert bleibt; hierdurch besteht die aerobe Flora des Stuhls fast ausschliesslich aus grampositiven Kokken (*Stickl* und *Gaertner*,<sup>348</sup> *Ivánovics*<sup>167</sup>). Anscheinend können auch andere Streptokokkenstämme widerstandsfähiger sein als der Durchschnitt: *Francis*<sup>110</sup> konnte aus den Kranken einer chirurgischen Abteilung Stämme isolieren, die selbst auf einem 20 mg % Sulfanilamid enthaltenden Blutagar lebhaft wuchsen. Diese resistenten Stämme gehören in die *Lancefield'sche* Gruppe A Typ 12. Ähnliche Beobachtungen machten *Colebrook*<sup>59</sup> und seine Mitarbeiter mit einzelnen Stämmen der Streptokokkentypen 11, 12 und 25. Hinsichtlich der Sulfanilamidempfindlichkeit verhalten sich die Streptococcusgruppen B und C verschiedenlich: letztere sind widerstandsfähiger als die erstgenannten (*Ivánovics*<sup>164</sup>).

Empfindlichkeitsunterschiede lassen sich nicht nur bei den Streptokokken, sondern auch bei den verschiedensten anderen Erregern nachweisen. Die Unterschiede stellen zumeist Eigenschaften der Stämme dar; es wurde nämlich festgestellt, dass auch jene Stämme verschiedentlich empfindlich sind, die aus einer Periode vor der Sulfanilamidära stammen. Die Sulfanilamidempfindlichkeit der Pneumokokkenstämme wurde zuerst von *MacLean*, *Rogers* und *Fleming*<sup>249</sup> (1939) eingehend geprüft. Mit der „slide cell“-Technik wurde für die einzelnen Stämme eine wechselnde, vom Typ unabhängige Sulfapyridinempfindlichkeit gefunden. Ähnliche Beobachtungen machten auch *Schmith*,<sup>328</sup> *Cotler*, *Kirchner* und *Romano*,<sup>64</sup> *Moore*, *Thomas* und *Hoyt*,<sup>279</sup> *Grumbach* und *Hegglin*.<sup>137</sup> Dagegen fanden *Lowell*<sup>237</sup> und seine Mitarbeiter bei den Pneumokokkenstämmen Typ 3,5 und 25 einen über dem Durchschnitt liegenden Widerstand.

Von den übrigen Krankheitserregern des Menschen können die Gonokokken,<sup>186</sup> <sup>328</sup> Pneumokokken,<sup>326</sup> Colibazillen<sup>365</sup> und einzelne Staphylokokkenstämme<sup>159</sup> verschiedene Grade der Sulfanilamidempfindlichkeit aufweisen. Die Gono- und Meningokokken sind vielleicht am meisten empfindlich, während die Empfindlichkeit der



Colibazillen durchschnittlich vielleicht niedriger ist als die der anderen erwähnten Bakterien.

Zweifelsohne beruht die Sulfanilamidempfindlichkeit zum Teil auf einer genetischen Basis, d. h. die Arzneiempfindlichkeit stellt eine ursprüngliche Eigenschaft der Spezies, Typen bzw. Stämme dar. Andererseits können aber empfindliche Stämme in resistente übergeführt werden. Diese Umwandlung wurde bei dem mit Sulfanilamid behandelten kranken Menschen zuerst von Ross<sup>317</sup> erwiesen. Er fand, dass die am Anfang der Krankheit gewonnene Pneumococcuskultur gegenüber dem Arzneimittel empfindlicher war als die später gezüchtete. Die Anführung der klinischen Erfahrungen ist nicht unsere Aufgabe, an ihrer Stelle möchten wir die Frage nur mit den Daten der experimentellen Chemotherapie beleuchten. *Die Versuche haben nämlich schon bisher über jeden Zweifel hinaus bewiesen, dass die verschiedenen Krankheitserreger sowohl in vivo als auch in vitro in widerstandsfähigere Formen als die 'ursprüngliche' übergeführt werden können.*

Mit Hilfe der Dauerzüchtung in sulfanilamidhaltigen Nährböden lassen sich die Bakterienstämme an das Arzneimittel gewöhnen, wodurch ihr Widerstand zunimmt. Auf diese Weise gelang es MacLeod und Daddi<sup>253</sup> (1939) zum ersten Mal, widerstandsfähige Pneumokokken zu gewinnen. Sie impften ihren Pneumococcusstamm Typ 1 auf Nährböden weiter, die das Sulfapyridin in steigenden Konzentrationen enthielten und erzielten nach 33 Passagen einen Stamm, dessen Resistenz die ursprüngliche zehnfach überstieg. Gegen diese modifizierten Stämme konnten die Mäuse nicht geschützt werden. Andere Verfasser (Harris und Kohn,<sup>140</sup> Lowell, Strauss und Finland,<sup>237</sup> Schmuth,<sup>328</sup> Schmidt, Sesler und Dettwiler,<sup>327</sup> Ivánovics<sup>159</sup>) erhöhten mit dieser Methode die Sulfanilamidresistenz der verschiedensten Bakterien. Zur Gewöhnung eignet sich jedes Sulfanilamidderivat. Die im Reagenzglas widerstandsfähigeren Stämme sind auch im tierischen Organismus in jedem Fall widerstandsfähiger als der ursprüngliche Stamm. Auch die umgekehrte Regel ist gültig: der im Organismus resistenter gewordene Stamm verhält sich auch in vitro resistenter. Merkwürdigerweise hat die Aenderung der Sulfanilamidresistenz keine Virulenzänderung zur Folge und die erhöhte Resistenz wird zu einer bleibenden Eigenschaft des Stammes. Schmidt, Sesler und Dettwiler trugen ihre in vitro resistent gemachten Pneumokokken Typ 1 und 3 durch 200 Mäusepassagen, ohne eine Abnahme der Arzneiresistenz beobachtet zu haben.

Schon bisher wurde des öfteren darauf hingewiesen, dass die zu Beginn der Sulfanilamidepoche derart erfolgreiche Gonorrhöebehandlung weniger aussichtsreich geworden sei. Den Grund hierfür erblickt man in der Sulfanilamidresistenz der Gonokokken. Zweifellos ist die Arzneiempfindlichkeit der Gonokokken veränderlich und sie lässt sich in vitro steigern (Westfal, Charles und Carpenter,<sup>376</sup> Schmuth,<sup>328</sup> Domagk,<sup>79</sup> Kimmig<sup>186</sup>). Die Pathogenität der künstlich resistenter gemachten Gonokokkenstämme erscheint im Gefolge der Beobachtungen Kimmigs in einem sehr interessanten Licht. Er fand nämlich, dass der auf Cibazol enthaltendem Aszitesagar gezüchtete Gonococcusstamm nach der 17. Überimpfung oder später, während seine Arzneiverträglichkeit erheblich zunahm, seine men-

schenpathogene Eigenschaft einbüsste; die mit solchen Stämmen experimentell infizierten Menschen erkrankten nicht an Gonorrhöe. Die Einbüssung der Pathogenität war vom Cibazolgehalt des Nährbodens bedingt: die nur auf Aszitesagar gezüchteten Stämme waren selbst nach der 70. Überimpfung infektiösfähig.

Wie erwähnt, lässt sich der Widerstand der verschiedensten Bakterien (Pneumococcus, Coli, Streptococcus, Typhus, B. paratyphosus usw.) gegenüber den Sulfanilamidderivaten durch Gewöhnung erhöhen. Dagegen fanden wir keine einzige Literaturangabe über die künstlich herbeigeführte Resistenz des Streptococcus haemolyticus. Vielleicht kann die Arzneiempfindlichkeit dieses Mikroorganismus schwerer beeinflusst werden als die der anderen Krankheitserreger. Die Versuche von *Bordás*<sup>30</sup> sprechen wenigstens für diese Annahme; er versuchte die Sulfanilamidresistenz des Stammes Richard in der Weise zu steigern, dass er die mit diesem Stamm infizierten Tiere vorsichtig mit methylenesulfoxy-saurem Sulfanilamidnatrium behandelte. Trotz der zahlreichen Passagen konnte in der Empfindlichkeit des Stammes keine Änderung festgestellt werden. Auch die mit splenektomierten Mäusen durchgeführten Versuche waren erfolglos. Diese Beobachtung liefert vielleicht die Erklärung dafür, dass Kliniker, meines Wissens, nie über arzneifest gewordene Streptococcusinfektionen berichteten.

Für das Resistenzproblem kommt dem Umstand, dass *die Arzneifestigkeit hinsichtlich der einzelnen Sulfanilamidderivate nicht spezifisch ist, eine ausserordentliche Wichtigkeit zu. Demnach besitzt der gegenüber einem Sulfanilamidderivat resistent gewordene Stamm einen grösseren Widerstand auch den anderen Sulfanilamiden gegenüber.* Bei dem bekannten Mechanismus der Sulfanilamidwirkung ist diese Tatsache eher selbstverständlich als überraschend, da die Sulfanilamide bekanntlich in der nämlichen Weise wirken, weshalb auch der Resistenz eine gemeinsame Ursache zugrunde liegen müsste. Die einfachste Erklärung der Arzneifestigkeit wäre durch die Annahme gegeben, dass die arzneifesten Stämme mehr p-Aminobenzoessäure erzeugen als die ursprünglichen. Wir wollen nun diese Annahme auf ihre Richtigkeit hin prüfen.

Im Kap. IV. wurde schon erwähnt, dass die Bakterien ihren Bedarf an p-Aminobenzoessäure mit wenigen Ausnahmen selbst decken. Ausser einem Hinweis auf die Ergebnisse von *Stamp*,<sup>340</sup> *Green*<sup>127</sup> und anderen ist hier auch die Frage zu besprechen, wie sich die Stoffe mit einer Antisulfanilamidwirkung in den Kulturen der einzelnen Bakteriumarten mengenmässig verteilen. *MacLeod*<sup>252</sup> prüfte in flüssigen Kulturen von empfindlichen und arzneifesten Bakterien die Frage, ob sich der Hemmstoff vorwiegend in den Bakteriumkörpern oder im Nährboden befindet. Bei den im synthetischen Nährboden gezüchteten Colibazillen fand er den Hemmstoff nur in den Zellen, die nach Abzentrifugieren zurückbleibende Flüssigkeit war vollkommen frei von dem Stoff. Diese Beobachtung wurde von *Kohn* und *Harris*<sup>197</sup> restlos bestätigt. Ähnliche Verhältnisse fand *MacLeod* im Falle des Streptococcus D (Enterococcus). Bei der Züchtung verwendete er einen Leberextraktnährboden. Ähnlich verfuhr er mit dem Pneumococcus Typ 1, dennoch fand er den Hemmstoff nicht im Bakteriumleib, sondern ausschliesslich in der Nährbodenflüssigkeit.

Ferner fand er, dass *die Kultur des resistenten Stammes mehr Hemmstoff enthielt als der ursprüngliche Stamm des Pneumococcus Typ 1*. Für diesen Fall scheint also obige Annahme gültig zu sein. Desgleichen erzeugt ein resistenter Stamm von *Bac. paramelitensis* mehr Hemmstoff als der ursprüngliche Stamm (*Green und Bielschowsky*<sup>128</sup>); dies bezieht sich aber nur auf das Zentrifugat, da die Autolysate in beiden Fällen gleich wirksam waren.

Nach *Green und Bielschowsky*<sup>128</sup> (1942) gäbe es theoretisch mehrere Wege zur Sulfanilamidresistenz eines gegebenen Stammes. 1. Der arzneifeste Stamm führt die Synthese der p-Aminobenzoensäure rascher durch als der empfindliche. 2. Die erzeugte p-Aminobenzoensäure bleibt in den Zellen eingeschlossen. 3. Die zwei Faktoren können kombiniert wirken. 4. Der arzneifeste Stamm hat einen geringeren p-Aminobenzoensäurebedarf.

Unsere 1941 veröffentlichten Versuche<sup>159</sup> haben Beweise für die Annahme geliefert, dass im Mechanismus der Sulfanilamidresistenz wenigstens zwei Faktoren mitspielen. Da uns ähnliche Versuche im Schrifttum nicht begegneten, scheint die ausführliche Besprechung unserer eigenen angebracht zu sein. Die Sulfamethylthiazolempfindlichkeit der ursprünglichen und der arzneifesten gewordenen Stämme sowie der in ihrer Anwesenheit festgestellte p-Aminobenzoensäure-antagonismus ist aus Tabelle 27. ersichtlich.

Tabelle 27.

*Die antagonistische Wirkung der p-Aminobenzoensäure auf Sulfamethylthiazol bei Verwendung verschiedener Staphylokokkenstämme.*

(Konzentration des Sulfamethylthiazol: mol/1000).

| Bezeichnung des Stammes | Original-Stamm      |    | Resistent-Stamm     |     |
|-------------------------|---------------------|----|---------------------|-----|
|                         | Bakteriostat.-titer | Qu | Bakteriostat.-titer | Qu  |
| Stamm B                 | mol/323.0.0         | 14 | mol/10.000          | 220 |
| Stamm IX                | mol/480.000         | 31 | mol/21.000          | 66  |
| Stamm VI                | mol/550.000         | 7  | mol/15.000          | 133 |
| Stamm X                 | mol/60.000          | 21 | mol/8.300           | 35  |

Wie die Tabelle zeigt, kam es bei zwei Stämmen zu einer Aenderung des die tatsächliche p-Aminobenzoensäurewirkung ausdrückenden Qu-Wertes. 1 mol p-Aminobenzoensäure vermochte im Falle des Stammes B die Wirkung von 14 mol Sulfamethylthiazol aufzuheben, im Falle der arzneifesten Variante genügte diese Menge von p-Aminobenzoensäure für 220 mol des Präparates. Eine ähnliche Aenderung erfuhr auch der Stamm VI. Bei zwei anderen Stämmen blieb der Qu-Wert im wesentlichen unverändert.

Parallel mit diesen Versuchen bestimmten wir auch die Anti-sulfanilamidwirkung der resistenten Kulturen im Vergleich mit den ursprünglichen. Um den Hemmstoff aus dem Nährboden und dem Bakteriumleib gleichweise ohne Verlust erhalten zu können, wurden die im gereinigten Caseinnährboden gezüchteten Bakterien einer Kombination der Autolyse und der Ammoniumhydroxydextraktion

unterzogen. Auf diese Weise wurden hinsichtlich der Antisulfanilamidwirkung je drei ursprüngliche und arzneifeste Stämme untersucht.

Je 100 ccm Caseinnährboden wurden mit den betreffenden Stämmen beimpft und sechs Tage bei 37° bebrütet. Nun wurde den Kulturen Ammoniumhydroxyd bis zur Konzentration mol/25 gegeben und nach Versetzung mit einigen Tropfen Toluol weitere 3 Tage im Brutschrank gehalten. Nach drei Tagen wurden die Kolben 30 Minuten in ein 65° Wasserbad gestellt, die Zellen abzentrifugiert, die Flüssigkeit mit Salzsäure sorgfältig neutralisiert und über Wasserbad auf 30 ccm eingedampft. Nach Entfernung des unlöslichen Teils wurde der Extrakt bei 105° 30 Min. sterilisiert.

Zur Untersuchung des extrahierten Antisulfanilamid wurden in eine Reihe von Röhrchen je 4 ccm Caseinnährboden, je 0,1 ccm mol/100 Sulfanilamidlösung und verschiedene Mengen der Extrakte eingetragen und nach Ergänzung des Röhrcheninhaltes auf 5 ccm mit dest. Wasser mit einigen Tausend Staphylokokken beimpft (Stamm B.) Die nach 24 Stunden abgelesenen Ergebnisse sind in Tabelle 28. enthalten.

Tabelle 28.

*Die antagonistische Wirkung der Extrakte aus verschiedenen Staphylokokkenstämmen auf Sulfanilamid.*

(Konzentration des Sulfanilamid: mol/5000).

| Menge des Extrakts (ccm) | Staph. Nr IX |         | Staph. Nr VI |         | Staph. B |         |
|--------------------------|--------------|---------|--------------|---------|----------|---------|
|                          | Orig.        | Resist. | Orig.        | Resist. | Orig.    | Resist. |
| 0,9                      | —            | +++     | —            | +++     | —        | —       |
| 0,7                      | —            | +++     | —            | +       | —        | —       |
| 0,5                      | —            | +++     | —            | —       | —        | —       |
| 0,3                      | —            | +++     | —            | —       | —        | —       |
| 0,2                      | —            | +++     | —            | —       | —        | —       |
| 0,2                      | —            | +       | —            | —       | —        | —       |
| 0,0                      | —            | —       | —            | —       | —        | —       |

Anmerkung: Orig. = Originalstamm; Resist. = resistenter Stamm. Die kein Sulfanilamid enthaltende Kontrolle zeigt ein +++ Wachstum.

Die Tabelle zeigt, dass sich die Extrakte der einzelnen Stämme hinsichtlich der Antisulfanilamidwirkung sehr verschiedentlich verhalten. In den Extrakten der ursprünglichen Kulturen konnte eine Antisulfanilamidwirkung nicht nachgewiesen werden, hingegen war die resistente Variation des Stammes IX. äusserst wirksam. Von den zwei anderen resistenten Stämmen erwies sich nur der mit VI. bezeichnete als wirksam, seine Wirkung aber war recht gering. Die resistente Variante des Stammes B war in diesen Versuchen vollkommen unwirksam. Dies bedeutet, dass *die Sulfanilamidfestigkeit eines Staphylokokkenstammes nicht unbedingt auf einer erhöhten p-Aminobenzoesäureproduktion fusst.*

Wir müssen bemerken, dass diese Beobachtung mit der von MacLeod,<sup>252</sup> wonach von den Staphylokokkenstämmen ein Stoff mit intensiver Antisulfanilamidwirkung reichlich sezerniert wird, nicht in Einklang steht. Wir glauben aber diesen Unterschied auf technische Momente zurückführen zu können, da die Nachweisbarkeit der Antisulfanilamidwirkung einer Bakteriumkultur hochgradig von den technischen Umständen bestimmt wird. MacLeod verwendete als Nährboden

frische Leberauszüge; obwohl dieser Nährboden in seinen Vorversuchen keine Antisulfanilamidwirkung aufwies, kann das Freiwerden der evtl. gebundenen p-Aminobenzoesäure im Laufe der Bakterientwicklung nicht ausgeschlossen werden. Einen wesentlichen Unterschied bedeutet der Umstand, dass MacLeod die Antisulfanilamidwirkung der Kulturen in synthetischem Nährboden an Colibazillen prüfte, während unsere Versuche in Caseinnährboden an Staphylokokken ausgeführt wurden. Die Methode von MacLeod ist unserer Ansicht nach — hierauf wurde bereits wiederholt hingewiesen — zum spezifischen Nachweis der p-Aminobenzoesäure ungeeignet. Der Grund dafür, dass wir in der Kultur des ursprünglichen Stammes keine Antisulfanilamidwirkung nachweisen konnten, kann auch in der verhältnismässig kleinen Menge des Extraktes und des verhältnismässig grossen Sulfanilamidüberschusses liegen.

Auf Grund unserer Versuche kann der resistente Stamm des *Staphylococcus aureus* sich von dem ursprünglichen auf zweierlei Art unterscheiden: 1. Entweder erzeugt der resistente Stamm mehr p-Aminobenzoesäure als der ursprüngliche, 2. oder der resistente Stamm ist gegenüber der p-Aminobenzoesäure in gesteigertem Masse empfindlich. Diese zwei Eigenschaften können — entsprechend den einzelnen Stämmen — gesondert oder kombiniert (z. B. Stamm VI.) auftreten. Die Bedeutung der erhöhten p-Aminobenzoesäureerzeugung für die Resistenz braucht nicht dargelegt zu werden. Das Wesen der anderen Eigenschaft kann auch so bestimmt werden, dass der resistente Stamm die p-Aminobenzoesäure besser ausbeutet als der ursprüngliche. Bei der besseren Ausbeutung der p-Aminobenzoesäure kommt es wahrscheinlich darauf an, dass das Apoferment des resistenten Bakteriums eine grössere Affinität zu diesem Stoff besitzt als ursprünglich. Betrachtet man Formel (III) auf Seite 85 so wird sofort klar, dass der die Sulfanilamidwirkung ausdrückende Wert  $k_s$  von dem Synplex, den das Apoferment (P) mit dem Sulfanilamid bzw. der p-Aminobenzoesäure bildet, bzw. von der Dissoziationskonstante des Synplexes bestimmt wird. Demnach kann als variabler Faktor auch die Eigenschaft des Apofermentes eine Rolle spielen. Die nähere Natur des Apofermentes konnte noch nicht ermittelt werden, es ist aber fast bestimmt ein Stoff von Eiweisscharakter, also ein Teil des Bakteriumplasmas. Mit Rücksicht auf die hochgradige Variations- und Adaptationsfähigkeit der Bakterien dürfte demnach angenommen werden, dass das Apoferment sich entsprechend den Umständen modifiziert. Das Wesen dieser Modifizierung besteht vielleicht in einer stärkeren Affinität zur p-Aminobenzoesäure oder aber darin, dass das modifizierte Plasma mit dem Sulfanilamid einen lockereren Synplex bildet. Wie dem auch sein mag, das Ergebnis ist dasselbe: die Fermentfunktion nimmt ab, und es bedarf einer höheren Sulfanilamidkonzentration, um die Bakteriostase zustande zu bringen.

Wir sind demnach der Ansicht, dass bei der Entstehung der Sulfanilamidresistenz mehrere Faktoren mitspielen dürften: die eine ist die veränderte Zellfunktion, die gesteigerte Erzeugung von p-Aminobenzoesäure, die andere die Aenderung der Plasmastruktur, die gesteigerte Affinität zur p-Aminobenzoesäure. Die Aenderung der Struktur bzw. der Funktion kann selbstständig oder kombiniert auftreten. Es ist nicht ausgeschlossen — obwohl hierfür unserer Ansicht nach nur wenig Wahrscheinlichkeit besteht — dass im Mechanismus der Sulfanilamidfestigkeit ausser diesen auch noch andere Faktoren eine Rolle spielen.

## Teil B.

## VIII. Kapitel.

Antibiotische Eigenschaften und Wirkungsweise  
der Salicylsäure.1. Die „antiseptische“ Wirkung der Salicylsäure bzw.  
der Salicylate.

Im Gefolge der *Kolbe-Lautemannschen*<sup>199</sup> bedeutsamen Salicylsäuresynthese konnte dieser interessante und wichtige Stoff der Wissenschaft und der Industrie ohne Einschränkung zur Verfügung gestellt werden. Seine antiseptische Wirkung wurde zuerst von *Kolbe*<sup>198</sup> beschrieben, der seine gärungs- und fäulniswidrige Wirksamkeit beobachtet hatte. Nach *Kolbe* sei diese Eigenschaft nur der freien Säure eigen, die Salicylate seien wirkungslos. Wegen ihrer geringen Giftigkeit wurde ihr besonders in der Lebensmittelkonservierung eine praktische Wichtigkeit zugeschrieben. Wahrscheinlich gab diese Tatsache zu den zahlreichen Versuchen Anlass, die sich in den 80-er Jahren des vergangenen Jahrhunderts mit der antiseptischen Wirkung der Salicylate befassten. Wir wollen auf diese Arbeiten und Ergebnisse nicht eingehen. Die betreffenden Daten sind bei *Ellinger*,<sup>87</sup> *Schlenk*,<sup>322</sup> ferner im *Beilsteins* Handbuch der Organischen Chemie Bd. X. S. 56 zu finden.

Es gibt erheblich wirksamere, zugleich aber auch viel giftigere Antiseptica als die Salicylsäure. Die Wirkung der freien Säure und ihrer Salze auf die Bakterien ist nämlich ziemlich schwach. Folgende Angaben beziehen sich auf die Wirksamkeit. Nach *Hatzfeld*<sup>143</sup> werden die Choleravibrionen und Typhusbazillen in der 2‰-igen Salicylsäure in 10—24 Stunden getötet; das salicylsaure Natrium ist selbst in einer 5‰-igen Lösung unwirksam. *Campanini*<sup>17</sup> konnte die Entwicklung der Schimmelpilzkultur mit einer 0,5%-igen Salicylsäurelösung nicht verhindern. Die konservierende Wirkung der Salicylsäure und der Salicylate hängt nicht nur von der Art des zu konservierenden Stoffes ab, sondern auch von dem Ausmass seiner Verunreinigung mit Bakterien (*Heide* und *Jakob*<sup>145</sup>). Nach *Christian*<sup>55</sup> soll man mindestens 1% Salicylsäure dem gemahlenen Fleisch hinzugeben, um die Fäulnis verhüten zu können. *Eisenberg*<sup>84</sup> fand, dass das Natriumsalicylat im Agarnährboden vermischt etwas stärker entwicklungshemmend wirke. Das Wachstum von 12 verschiedenen Bakteriumarten wurde von dem Salicylat in der Konzentration von 0,0023—0,189 mol (0,04—3,2%) — entsprechend der individuellen Empfindlichkeit der Bakterien — gehemmt. Der Umstand, dass das Wachstum der Bakterien von dem Salicylat gehindert wird, bedeute nach *Dellennay*<sup>70</sup> noch bei weitem nicht, dass sie getötet werden. Dagegen vertreten *Garoffeau* und *Joan*<sup>120</sup> die Ansicht, dass das Salicylat durch Tötung der Bakterien konserviere.

Der ausführlichen Besprechung der Salicylsäurewirkung soll ein Problem von allgemeiner Bedeutung vorausgeschickt werden, das die Art der antibiotischen Wirkung und ihre Nomenklatur betrifft. Für einzelne Mittel ist die Entwicklungshemmung, d. i. die Bakteriostase kennzeichnend. Wie gezeigt, ist diese Wirkung typisch für die Sulfanilamide. Andere Stoffe — z. B. das Phenol — vernichten die Mikroben durch Schädigung des Plasmas. Versetzt man z. B. eine Fleischbrühe mit cca mol/80 Phenol und beimpft diesen Nährboden mit einigen Tausend Bakterien, so nimmt die Zahl der lebenden Bakterien in der Kultur schnell ab und der Nährboden wird bald steril. In einer etwas niedrigeren Konzentration, z. B. bei mol/250, ist die Entwicklung der abgeimpften Bakterien schon sehr wenig gestört. Die Verbindung hat demnach nur eine bakterizide Wirkung.

In Zusammenhang mit den antibiotischen Eigenschaften liest man in den Lehrbüchern nur von der antiseptischen und Desinfizienzwirkung. Nach *R. Koch* bedeute die Desinfektion die Unschädlichmachung der Krankheitserreger; obson dieser Begriff mit der Sterilisierung nicht ganz identisch ist (s. *Reichel*<sup>109</sup>), werden ihre Unterschiede in der Praxis vernachlässigt. Im allgemeinen versteht man unter Antisepsis einen milderen Vorgang, in dessen Verlauf die Keime nicht getötet, sondern nur in ihrer Entwicklung gehindert werden. *R. Koch* nannte ursprünglich die Störung der Bakteriumvermehrung Entwicklungsbehinderung, dieser Begriff wird aber oft selbst in dem wissenschaftlichen Schrifttum mit der Antisepsis identifiziert. Heute scheint es zweckmässiger, besonders bei der Besprechung experimenteller Fragen, anstelle der erwähnten Begriffe von Bakterizidie und Bakteriostase zu sprechen. Durch Erforschung des Wirkungsmechanismus der Sulfanilamide ist die Bakteriostase heute schon zu einem genau definierten Begriff geworden. Man weiss, dass bei der typischen Bakteriostase die Keime nicht sofort vernichtet sondern nur in reversibler Weise geschädigt werden und ihr Tod nur durch den Stillstand der Vermehrung bedingt ist.

Im meinen früheren Arbeiten wurde die antibiotische Eigenschaft des Salicylats auch von mir mit dem Wort antiseptisch belegt. Dieser Bezeichnung lag die Unkenntnis des Wirkungsmechanismus zugrunde. In der vorliegenden Arbeit — obwohl gewisse Einzelheiten des Wirkungsmechanismus noch immer nicht geklärt sind — wird dieses Wort soweit wie möglich vermieden, um evtl. Missverständnissen vorzubeugen. Einzelne Verfasser, besonders englische, fassen die antiseptische Wirkung ganz ausdrücklich nicht als Bakteriostase sondern als Bakterizidie auf. *Wenn im folgenden von bakteriostatischer Wirkung gesprochen wird, soll dies nicht in dem Sinne aufgefasst werden, dass die beobachtete Wirkung mit der bakteriostatischen wirklich identisch sei; denn bei der Bezeichnung war nicht die Art der Wirkung massgebend sondern die Methode, die bei der Untersuchung der antibiotischen Eigenschaften herangezogen wurde.*

Auf Grund der angeführten Literaturangaben ist die antibiotische Eigenschaft der Salicylsäure und besonders des Salicylats nicht bedeutend. Die Methoden der Verfasser waren aber nicht einheitlich. Aus diesem Grund erachtete ich für die Revision der Frage die Schaffung einer standarden Methodik für wesentlich. Diese hier zusammengefassten Studien, die seit 1940 ausgeführt und in mehreren Publikationen<sup>100, 101, 102, 103</sup> mitgeteilt wurden, hatten vor allem den Zweck, die Intensität der Salicylatwirkung in dem Fall zu ermitteln, wenn die antibiotische Wirkung ausschliesslich vom Gesichtspunkte der Wachstumshemmung aus geprüft wird. Als besonders interessant erschien mir die Erforschung der qualitativen und quantitativen Verhältnisse dieser Eigenschaft, ferner ihre Vergleichung mit ähnlichen Eigenschaften anderer Verbindungen, insbesondere der Sulfanilamide.

Bei den Versuchen wurden dieselben Grundsätze befolgt, die auch bei der Messung der direkten Sulfanilamidwirkung massgebend waren. Auf den Nährboden, die Zahl der abgeimpften Keime usw. wurde Rücksicht genommen. Der Nährboden wurde in Reagenzröhrchen mit verschiedenen Mengen einer genauen neutralen Lösung von salicylsaurem Natrium versetzt, der Röhrcheninhalt auf das

gleiche Volumen ergänzt und mit einem relativ kleinen Inoculum beimpft. Das Inoculum stammte aus einer Bouillon- oder Agarkultur und enthielt — auf 5—10 ccm Gesamtvolumen — einige Tausend Keime. Auf diese Weise wurde die grösste Verdünnung des Salicylats bzw. der anderen geprüften Verbindung festgestellt, die nach 24 oder 48 Stunden das mit freiem Auge merkbare Wachstum verhinderte.

Die verwendeten Nährböden waren den Ansprüchen der Bakterien und dem verfolgten Zweck angemessen. In dieser Arbeit wird oft der Caseinnährboden erwähnt. *Wenn im weiteren der Nährboden nicht genannt wird, so ist darunter immer ein aus Caseinhydrolysat hergestellter Nikotinsäure und Aneurin enthaltender Nährboden zu verstehen, der auf S. 56 beschrieben wurde.*

Die bakteriostatische Wirkung des Salicylats und der Sulfanilamide — und auch anderer Verbindungen — im Caseinnährboden gegenüber Staphylokokken wurden in Tab. 15 bereits verglichen. In diesen Versuchen war die bakteriostatische Wirkung des Salicylats erheblich geringer als die des Sulfanilamid, hingegen beträchtlich grösser als die des Phenols. In Fleischbrühe sind diese Versuche ganz anders ausgefallen. Die Sulfanilamidwirkung war kaum ein siebentel der vorigen, das Phenol war genau in derselben Konzentration wirksam wie in dem Caseinnährboden, das Salicylat konnte aber in diesem Fall das Kokkenwachstum selbst in einer Konzentration von mol/100 nicht verhindern. In der Fleischbrühe konnte mol/100 (0,16%) Salicylat auch die Entwicklung anderer Bakterien (Pneumococcus, Streptococcus, Ruhr, Coli, Typhus) nicht verhindern. Dieser Versuch bestätigt also die alten Erfahrungen, nach denen die antiseptische Wirkung des Salicylats unerheblich ist. Die Versuche der betreffenden Forscher wurden in Fleischbrühe oder einem anderen komplexen Nährboden ausgeführt.

Die bakteriostatische Wirkung des Salicylats war selbst im Caseinnährboden nicht gegenüber allen Erregern nachzuweisen. So zeigten die Colibazillen bei einer Salicylatkonzentration mol/100 noch ein merkbares Wachstum. Auffallend dagegen war, dass derselbe Stamm in einem einfacheren Milieu als der Caseinnährboden und zwar in der Glucose-Ammoniumsulfat-Nährlösung, wo die Glucose die einzige Kohlenstoff- und das Ammoniumion die einzige Stickstoffquelle darstellt, selbst bei grösster Salicylatverdünnung nicht gedeihen konnte. Zur Wachstumsbehinderung genügte hier eine Salicylatkonzentration mol/25.000—mol/50.000.

Aus diesen Beobachtungen folgt, dass *die bakteriostatische Wirkung des Salicylats vor allem von der Zusammensetzung des verwendeten Nährbodens abhängt.* Mit Rücksicht darauf war die Frage zu prüfen, in welcher Weise die in einem gewissen Nährboden beobachtete bakteriostatische Wirkung von den verschiedenen dem Nährboden zugesetzten Stoffen beeinflusst wird. Zu diesen Versuchen wurde der Caseinnährboden in der Konzentration von mol/200 mit Salicylat versetzt, mit einigen Tausend Keimen des entsprechenden Staphylococcusstammes beimpft und mit der sterilen Lösung des zu untersuchenden Stoffes vermengt. Die bakteriostatische Wirkung des Salicylats wurde von kleinen Mengen der Leber-, Fleisch- und Hefeauszüge, von einigen mg Pepton oder 0,2—0,3 ccm Urin aufgehoben. Diese Erscheinung hat mit der Sulfanilamidinterferenz gemeinsame Züge. Es scheint, dass diese Stoffzusätze etwas enthal-



ten, was sich gegenüber der bakteriostatischen Salicylatwirkung antagonistisch verhält. Die Frage war nun zu prüfen, ob die antagonistische Wirkung der verschiedenen Zusätze auf denselben Stoff zurückzuführen sei — ob es sich um eine spezifische Wirkung handle — oder es nur darauf ankomme, dass sich in dem nährstoffreichen Medium die Salicylatwirkung nicht geltend machen könne. Einer der Versuche brachte die Antwort auf diese Frage. Bei diesem Versuch war die Salicylatwirkung in einem Nährboden, in dem früher Colibazillen gezüchtet und durch Filtrierung entfernt wurden, schwächer als in dem Originalnährboden, obwohl der gebräuchte Nährboden an Nährstoffen — bzw. Energiespendern — sicher ärmer war. *Dieser Versuch liess darauf schliessen, dass die Bakterien im Lauf ihrer Vermehrung einen Stoff erzeugen, der sich dem Salicylat gegenüber antagonistisch verhält.*

Im weiteren wollten wir feststellen, ob dieser angenommene wasserlösliche Stoff mit einem der bisher bekannten biologisch wirksamen Stoffe identisch ist. Von diesem Stoff konnten wir feststellen, dass er in dem wässrigen Auszug der nach dem Tod des Tieres frisch verarbeiteten Leber nicht enthalten war, seine Menge aber im Laufe der Autolyse rasch zunahm und in dem schon stark autolysierten Lebergewebe in grossen Mengen gefunden werden konnte. Der salicylwidrige Stoff verträgt das Kochen in einem schwach-saurem-neutralen Medium ziemlich gut; seine Erhitzung in einem alkalischen Milieu — besonders im Autoklav — hat eine wesentliche Abnahme der Wirkung zur Folge. Es konnte festgestellt werden, dass der Stoff mit keinem der nachstehenden identisch ist: Aneurin, Adermin, Nikotinsäure und -amid, Cozymase, p-Aminobenzoesäure, Lactoflavin, Adenylsäure. Entgegen diesen Stoffen *wird die bakteriostatische Wirkung des Salicylats von der Pantothenensäure ausserordentlich stark behindert.* Cca 0,5—1,0  $\gamma$  reichen aus, die bakteriostatische Wirkung des Salicylats in 5 ccm Nährboden aufzuheben. Dies geht aus dem in Tabelle 29. aufgestellten Versuch hervor.

Tabelle 29.

*Prüfung des zwischen Natriumsalicylat und Pantothenensäure bestehenden Antagonismus in Gegenwart von Staphylococcus aureus (Stamm „B“).*

| Salicylatkonzentration  | Pantothenatkonzentration | Wachstum |
|-------------------------|--------------------------|----------|
| O (Kontrolle) . . . . . | 0                        | +++      |
| mol/750 . . . . .       | 0                        | —        |
| mol/900 . . . . .       | 0                        | —        |
| mol/1.500 . . . . .     | 0                        | —        |
| mol/1.870 . . . . .     | 0                        | +++      |
| mol/100 . . . . .       | 0                        | —        |
| mol/100 . . . . .       | mol/1,000.000            | +++      |
| mol/100 . . . . .       | mol/1,700.000            | +++      |
| mol/100 . . . . .       | mol/5,000.000            | —        |

Aus dieser Beobachtung folgt, dass die bakteriostatische Wirkung des salicylsauren Natriums bei Vorhandensein von Pantothen-säure nicht zur Geltung kommen kann, da die Wirkung durch kleinste Mengen dieses Stoffes aufgehoben wird.

## 2. Nähere Verhältnisse der Pantothensäureinterferenz.

Obige Beobachtung liefert die Erklärung dafür, warum die bakteriostatische Wirkung des Salicylats im Pepton-Fleischextrakt-Nährböden nicht beobachtet werden kann. Die Pantothensäure ist — wie ihr Name zeigt — ein in der Natur sehr verbreitetes Vitamin, das in pflanzlichen und tierischen Organen gleichweise enthalten ist. Aus diesem Grunde sind die aus natürlichen Stoffen hergestellten Nährböden zum Nachweis der spezifischen Salicylatwirkung nicht geeignet. Zur Veranschaulichung dieser spezifischen Wirkung ist der aus Caseinhydrolysat hergestellte Nährboden scheinbar in gewissen Fällen geeignet, obwohl das Casein mit den Spuren dieses Vitamins verunreinigt ist! Es hat nun den Anschein, als ob die Geringfügigkeit der Verunreinigung und der Umstand, dass die Pantothensäure im Laufe der Säurehydrolyse in ihre Bausteine — Dioxysocaprönsäure und  $\beta$ -Alanin — aufgespalten wird, die Salicylatwirkung, nicht beeinträchtigen. Die idealsten Umstände können im Falle der wenig anspruchsvollen Krankheitserreger — *Coli*, *Proteus*, usw. — geschaffen werden, da sich diese Bakterien schon in den einfachsten Nährlösungen entwickeln. Aber die meisten pathogenen Mikroorganismen erfordern für ihre Entwicklung erheblich mehr. Unter Beachtung dieser Umstände habe ich das Verhalten der in der Humanpathologie wichtigen Bakterien gegenüber dem Salicylat systematisch studiert. Die Ergebnisse lassen sich im folgenden zusammenfassen.

*Staphylococcus aureus*: Im Caseinhydrolysatnährboden wird das Wachstum der verschiedenen Stämme vom Natriumsalicylat ungefähr bis zur Verdünnung mol/200—mol/500 gehemmt. Im Falle eines Stammes war sogar die Verdünnung m/1.000 wirksam. Die bakteriostatische Wirkung wird durch minimale Pantothensäuremengen aufgehoben. In einem Versuch vernichtete 1 Molekül dieses Vitamins

|                                 |                                       |
|---------------------------------|---------------------------------------|
| in der Konzentration von mol/62 | Salicylat die Wirkung von 20.100 mol, |
| " " " " mol/125                 | " " " " 26.400 "                      |
| " " " " mol/250                 | " " " " 33.400 "                      |
| " " " " mol/500                 | " " " " 40.000 "                      |

Salicylat. Somit ist die Wirkung der Pantothensäure hochgradig spezifisch.

Anders verhält es sich bei der Anwendung höherer Salicylatkonzentrationen. Bei einer Konzentration von mol/10—mol/20 wird die Salicylatwirkung durch die Pantothensäure nicht mehr aufgehoben. Diese Salicylatkonzentration konnte das Kokkenwachstum selbst in der gewöhnlichen Fleischbrühe verhindern.

*Typhus-, Paratyphusbazillen*: Die typische Salicylatwirkung konnte auch gegen diese Erreger nachgewiesen werden. Die Empfindlichkeit dieser Stämme ist im Caseinnährboden sehr verschieden. Die Versuche mit einigen Stämmen sind aus Tabelle 30. ersichtlich.

Tabelle 30.

*Der Salicylat-Pantothensäure-Antagonismus bei verschiedenen Typhus-Paratyphus-Stämmen.*

| Bakterienstamm                | Salicylat-empfindlichkeit* | Salicylatkonzentration | Pantothensäurekonzentration | Wachstum |
|-------------------------------|----------------------------|------------------------|-----------------------------|----------|
| Typhus . . . . .              | mol/160                    | mol/50                 | mol. $1,6 \cdot 10^{-4}$    | ++       |
| Paratyphus A . . .            | mol/1.000                  | mol/50                 | mol. $5 \cdot 10^{-6}$      | +++      |
| Paratyphus-Schottmüller . . . | mol/500                    | mol/50                 | mol. $5 \cdot 10^{-6}$      | +++      |
| Paratyphus-Breslau . . . . .  | mol/500                    | mol/50                 | mol. $5 \cdot 10^{-6}$      | +++      |

\* Die grösste Verdünnung, welche das Wachstum des Stammes vollkommen hemmt.

Bei Vorhandensein starker Pantothensäureverdünnungen vermehrten sich die Stämme auch dann, wenn wo das Mehrfache der hemmenden Salicylatkonzentration verwendet wurde. Dagegen war die Pantothensäure-Interferenz bei Vorhandensein höherer Salicylatkonzentrationen (cca mol/20) nicht mehr nachzuweisen.

**Ruhrbacillus:** Bei den untersuchten Stämmen kam die bakterio-statische Wirkung des Salicylats — einige Stämme ausgenommen — zur Geltung. Insgesamt 26 Flexner, Shiga, Sonne und Schmitz-Stämme wurden untersucht. Der Nährboden war das Caseinhydrolysat. Das Wachstum der Stämme wurde — mit Ausnahme von je 1 Sonne- und Flexner-Stamm — bis zur Salicylatkonzentration mol/100—mol/300 gehemmt. Die Pantothensäure-Interferenz wurde bei allen Stämmen beobachtet. In mehreren Fällen wiesen aber die Stämme bei mol/100 Salicylatkonzentration selbst bei Vorhandensein von Pantothensäure nur eine schwache Entwicklung auf. Die durch mol/50 oder höhere Konzentrationen ausgeübte Entwicklungshemmung wurde von der Pantothensäure nicht mehr behoben.

**Bac. proteus vulgaris:** Die mit einigen Proteusstämmen ausgeführten Untersuchungen (Ivánovics und Sonkoly<sup>171</sup>) können im folgenden zusammengefasst werden. Als Nährboden wurde die Laktat-Ammoniumsazlölösung von Fildes (s. S. 92) verwendet. Die Wirkung des Salicylats gegen den Proteusstamm No. 11. erhellt aus Tabelle 31.

Der Gesamtinhalt der Röhrchen war 10 ccm. In der einen Serie enthielten die Röhrchen nur Salicylat, in den zwei anderen auch Pantothensäure. Es ist deutlich zu sehen, dass das Salicylat bei Vorhandensein von Pantothensäure erheblich schwächer bakterio-statisch wirkt.

Ähnliche Versuche mit anderen Stämmen sind in Tabelle 32. aufgestellt.

Die typische Salicylwirkung konnte bei einer Salicylatkonzentration von mol/100 oder mehr gegenüber allen 4 Proteusstämmen festgestellt werden. Wurden die Röhrchen mit mol/50 Salicylat versetzt, so unterblieb das Wachstum selbst bei Vorhandensein einer grösseren Pantothensäuremenge. Auffallenderweise war im Casein-

Tabelle 31.

*Wachstum des Proteus vulgaris-Stammes Nr. 11 in den verschiedene Mengen von Salicylat und Pantothenat enthaltenden Nährböden.*

| Konz. des Salicylats | Die Menge der Pantothensäure pro 10 ccm Nährboden |        |        |        |        |        |
|----------------------|---|--------|--------|--------|--------|--------|
|                      | 0   |        | 1 γ    |        | 10 γ   |        |
|                      | 24 St.  | 48 St. | 24 St. | 48 St. | 24 St. | 48 St. |
| mol/100              | —   | —      | —      | —      | —      | —      |
| mol/120              | —   | —      | —      | +      | —      | +      |
| mol/200              | —   | —      | +      | +      | +      | +      |
| mol/330              | —   | —      | +      | +      | +      | +      |
| mol/500              | —   | —      | +      | +      | +      | +      |
| mol/1.000            | —   | +      | +      | +      | +      | +      |
| mol/1.200            | —   | +      | +      | +      | +      | +      |
| mol/3.300            | —   | +      | +      | +      | +      | +      |
| mol/5.000            | +   | +      | +      | +      | +      | +      |

Bemerkung: + = nach 24 bzw. 48 Stunden war der Nährboden trübe, — = kein mit freiem Auge merkbares Wachstum

Tabelle 32.

*Wachstum von 4 verschiedenen Proteus vulgaris-Stämmen in verschiedene Salicylat- und Pantothenatmengen enthaltenden Fildesschen Nährböden.*

Die in der Tabelle verzeichneten Werte bedeuten die grösste Salicylatverdünnung, bei der im 24- bzw. 48stündigen Versuch noch ein Wachstum stattfind.

| Bezeichnung des Stammes | Die Menge der Pantothensäure pro 10 ccm Nährboden |           |           |         |         |         |
|-------------------------|---|-----------|-----------|---------|---------|---------|
|                         | 0   |           | 1 γ       |         | 10 γ    |         |
|                         | 24 St.  | 48 St.    | 24 St.    | 48 St.  | 24 St.  | 48 St.  |
| Stamm 3                 | mol/1.000   | mol/1.000 | mol/1.000 | mol/120 | mol/500 | mol/120 |
| „ 11                    | mol/5.000   | mol/1.000 | mol/200   | mol/120 | mol/200 | mol/100 |
| „ 12                    | mol/1.200   | mol/330   | mol/100   | mol/100 | mol/100 | mol/100 |
| „ 15                    | mol/2.000   | mol/330   | mol/200   | mol/120 | mol/120 | mol/100 |

nährboden mindestens eine mol/10 betragende Salicylatkonzentration nötig, um das Wachstum der Proteusstämmen zu hemmen. In dieser Konzentration blieb aber die Salicylatwirkung von der Pantothensäure unbeeinflusst.

*Streptococcus haemolyticus*: Die Mitglieder der Gruppe B können in dem aus Caseinhydrolysat hergestellten Nährboden ohne Schwierigkeiten gezüchtet werden, wenn der Nährboden mit entsprechenden akzessorischen Stoffen versetzt wird (s. S. 59). Von dem *Streptococcus haemolyticus* ist bekannt, dass er nur bei Vorhandensein von Pantothensäure wächst. Um die Wirkung dieses Vitamins studieren zu können, wurde seine Menge entsprechend den einzelnen Versuchsserien geändert; der Pantothensäurezusatz betrug

bei den Versuchen 0,005—10  $\gamma$  pro 10 ccm Nährboden. Tabelle 33. enthält diese Ergebnisse.

Tabelle 33.

*Entwicklung des Streptococcus haemolyticus (Gruppe B) im Caseinnährboden bei verschiedenen Salicylat- und Pantothenatkonzentrationen.*

| Konz. des Salicylats | Die Menge der Pantothensäure pro 10 ccm Nährboden |                |               |              |            |             |
|----------------------|---|----------------|---------------|--------------|------------|-------------|
|                      | 0   | 0,005 $\gamma$ | 0,01 $\gamma$ | 0,1 $\gamma$ | 1 $\gamma$ | 10 $\gamma$ |
| O (Kontrolle)        | ±   | +              | ++            | +++          | +++        | +++         |
| mol/2.000            | ±   | +              | ++            | +++          | +++        | +++         |
| mol/1.000            | ±   | +              | ++            | +++          | +++        | +++         |
| mol/500              | ±   | +              | ++            | +++          | +++        | +++         |
| mol/250              | ±   | +              | ++            | ++           | ++         | ++          |
| mol/100              | —   | —              | —             | +            | +          | —           |
| mol/50               | —   | —              | —             | —            | —          | —           |

Bemerkung: Inoculumgröße:  $10^{-5}$  ccm Bouillonkultur. Versuchsdauer: 24 St. Die Kreuze geben den Grad des Wachstums an.

Wie ersichtlich, ist die bakteriostatische Wirkung des Salicylats von der Menge der zusätzlichen Pantothensäure vollkommen unabhängig. In jedem Fall kam das Kokkenwachstum bei der Konzentration mol/50—mol/100 zum Stillstand. Im Falle dieses Erregers konnte also eine für die Salicylatwirkung typische, mit Pantothensäure aufzuhebende Entwicklungshemmung nicht beobachtet werden.

**Colibazillen:** Wie erwähnt, ist im Falle dieses Bakteriums der Nährboden entscheidend für die Versuche. In dem Glucose und Ammoniumsalmz enthaltenden Nährboden ist die bakteriostatische Wirkung des Salicylats ausserordentlich stark; das Wachstum wurde, abhängig von den Colistämmen, schon in den Konzentrationen mol/25.000—mol/50.000 vollkommen behindert. Diese Wirkung war spezifisch; die Wirkung von Tausenden von Salicylmolekülen wurde durch 1 Molekül Pantothensäure aufgehoben. Zur Veranschaulichung soll einer der Versuche etwas ausführlicher besprochen werden.

Je 4 ccm der nach *Sahuyn*<sup>320</sup> und seinen Mitarbeitern hergestellten Glucose-Ammoniumsalmz-Nährlösung wurden mit verschiedenen Salicylatmengen versetzt und auf diese Weise verschiedene Verdünnungen hergestellt. Den Verdünnungsreihen wurde eine wechselnde Menge von Ca-pantothenat hinzugefügt, dann wurden die Röhrchen nach Ergänzung auf 5 ccm Inhalt mit einigen Tausend Colibazillen beimpft. Der Wachstumsgrad wurde nach 24 Stunden nephelometrisch bestimmt. Aus den Versuchen, die bei dem verschiedensten Salicyl: Pantothenat-Verhältnis durchgeführt wurden, haben wir das Verhältnis ermittelt, bei dem ein Drittel des maximalen Wachstums beobachtet werden konnte. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde in Tabelle 34. die Zahl der Salicylatmoleküle verzeichnet, deren Wirkung bei einer gewissen Salicylatkonzentration von 1 Molekül Pantothensäure aufgehoben wird.

Wurde die Salicylatkonzentration weiter erhöht, als in der Tabelle angegeben, z. B. bis mol/25, so blieb sogar mol/10<sup>4</sup> Pantothensäure — eine ansehnliche Konzentration — unwirksam.

Wir haben schon wiederholt erwähnt, dass die Entwicklung der Colibazillen im Caseinnährboden auch von beträchtlichen Salicylatkonzentrationen (mol/100) nicht gehemmt wird, obschon die bakteriostatische Wirkung in der Glucose-Ammoniumsalmz-Nähr-

Tabelle 34.

*Aufhebung der Salicylatwirkung durch Pantothenat bei Versuchen mit Colibazillen auf synthetischen Nährboden.*

| Die Salicylatkonzentration<br>(mol) | Die enthemmende minimale<br>Pantothenatkonzentration<br>(mol) | Pantothenatverdünnung |
|-------------------------------------|---|-----------------------|
|                                     |   | Salicylatverdünnung   |
| 1/500                               | $1/2 \cdot 10^7$  | 40.000                |
| 1/1.000                             | $1/2,5 \cdot 10^7$  | 25.000                |
| 1/2.000                             | $1/4 \cdot 10^7$  | 20.000                |
| 1/4.000                             | $1/5 \cdot 10^7$  | 12.000                |
| 1/6.000                             | $1/6 \cdot 10^7$  | 10.000                |
| 1/8.000                             | $1/6,6 \cdot 10^7$  | 8.333                 |

lösung sehr stark ist. Aus den bisherigen Ausführungen kann dieser auffallende Unterschied schwerlich erklärt werden. Der Erscheinung liegt kaum die Pantothersäure zugrunde. Obwohl das Casein Spuren von diesem Vitamin enthält, konnte damit die Erscheinung nicht gedeutet werden. Wir trachteten, die Ursache dieser Erscheinung mit Hilfe der nachstehenden Versuche zu finden.

Glucose-Ammoniumsalm-Nährlösung wurde mit mol/100—mol/50.000 Salicylat versetzt. Jeder Konzentrationsreihe wurde 1,25 mg des untersuchten Stoffes hinzugefügt, die Röhrchen mit einigen Tausend Colibazillen versetzt, der Inhalt bis 5 ccm aufgefüllt und nach 24 Stunden Züchtung der Grad der Entwicklung festgestellt. Bei diesen Versuchen hatte die durch Filtrierung sterilisierte Lösung des gereinigten Casein nur eine sehr schwache Antisalicylatwirkung. Wurde aber dieselbe Caseinmenge nach stattgefundener Säurehydrolyse in die Röhrchen eingeführt, so konnte das Bakterium selbst von einer Salicylatkonzentration mol/100 nicht gehindert werden. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Erscheinung nicht auf evtl. Verunreinigungen des Caseins sondern auf gewisse Aminosäuren zurückzuführen wäre. Nun versuchten wir, den Antisalicylatstoff aus dem Caseinhydrolysat zu isolieren. Trotz zahlreicher Versuche mit den verschiedensten Verfahren konnten wir das wirksame Prinzip in einer bedeutsamen Konzentration nicht herstellen. Dies gab zu dem Gedanken Anlass, dass die Antisalicylatwirkung nicht durch eine, sondern durch mehrere Aminosäuren bedingt sein dürfte. Wir sind daher später zu der Methode übergegangen, die Röhrchen mit je 1,25 mg der reinen, zum Teil synthetischen, Aminosäuren — einzeln oder kombiniert — zu versetzen. Es hat sich herausgestellt, dass jede Aminosäure eine gewisse kleinere oder grössere Antisalicylatwirkung besitzt. Einzeln verwendet wirkten sie im allgemeinen schwach, wurden sie aber kombiniert hinzugegeben, so kam es zu einer synergistischen Wirkungssteigerung. Gewisse Aminosäuren erwiesen sich als besonders intensiv synergistisch. *In diesem Sinne war das Methionin am stärksten wirksam, wenn es mit je einer Aminosäure kombiniert wurde. Im Falle einer Kombination von zwei Aminosäuren konnte die auffallendste Wirkung dann beobachtet werden, wenn Methionin mit Leucin, Valin oder Lysin kombiniert*

wurde. Ausser diesen war auch die Kombination mit Arginin und Histidin ziemlich wirksam. Merkwürdigerweise war die Wirkung der biologisch wertvollen zyklischen Aminosäuren unbedeutend.

Auf die weiteren Einzelheiten und Ursachen der Aminosäuren-Interferenz können wir hier nicht eingehen, wir kommen darauf bei der Erörterung der Wirkungsweise der Salicylate zurück. Hier sei nur soviel erwähnt, dass ein konzentrierteres Salicylat (cca mol/20) das Wachstum der Colibazillen selbst im Caseinnährboden verhindert. Diese Wirkung konnte aber durch Pantothenensäure nicht aufgehoben werden.

*Bac. proteus Morgan*: Diese Untersuchungen trugen zur Klärung des Wirkungsmechanismus des Salicylats wesentlich bei. Der Morgan-Bacillus ist im allgemeinen anspruchsvoller als der mit ihm nahe verwandte *B. proteus vulgaris*. Er braucht nicht nur Nikotinsäure sondern, ähnlich dem Streptococcus, auch Pantothenensäure und lässt sich ohne diese nicht züchten. Bei unseren Versuchen wurde der *Pelczar-Portersche*<sup>297</sup> Nährboden verwendet, der ausser Ammoniumsalzen und Glucose auch eine geringe Menge eines mit Alkali autoklavierten Proteose-Pepton enthält, wodurch die tadellose Entwicklung der Kultur gesichert ist. Unter entsprechenden Versuchsbedingungen verhält sich die Entwicklung der Morgan-Bazillen innerhalb gewisser Grenzen direkt proportional zur Menge der hinzugefügten Pantothenensäure. Die Wirkung des Salicylats auf diesen Bacillus wurde ähnlich wie bei den Streptokokkenversuchen bei Vorhandensein verschiedener Salicylat- und Pantothenatmengen geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle 35. zusammengestellt.

Tabelle 35.

*Das Wachstum des Morgan-Bacillus bei verschiedenen Na-Salicylat- und Ca-Pantothenatkonzentrationen.*

| Pantothenat-Konzentration | Salicylatkonzentration |           |         |         |         |        |
|---------------------------|------------------------|-----------|---------|---------|---------|--------|
|                           | 0                      | mol/1.000 | mol/600 | mol/200 | mol/100 | mol/50 |
| mol/2.10 <sup>6</sup>     | 100                    | 90        | 86      | 65      | 40      | 0      |
| mol/2.10 <sup>7</sup>     | 100                    | 90        | 88      | 65      | 45      | 0      |
| mol/2.10 <sup>8</sup>     | 95                     | 85        | 80      | 65      | 40      | 0      |
| mol/5.10 <sup>3</sup>     | 73                     | 63        | 60      | 51      | 45      | 0      |
| mol/10 <sup>9</sup>       | 50                     | 47        | 45      | 40      | 35      | 0      |
| mol/2.10 <sup>9</sup>     | 46                     | 43        | 42      | 40      | 36      | 0      |

Die Zahlen geben dem Grad des Wachstums in Prozenten an.

Die Ergebnisse stimmen also mit denen der Streptococcusversuche überein. Die Intensität des Wachstums wird von dem Verhältnis Salicylat: Pantothenat so wenig beeinflusst, dass dieser Faktor vollkommen vernachlässigt werden kann. Mit der Zunahme der Salicylatkonzentration lässt sich eine geringfügige Steigerung der Entwicklungshemmung beobachten, die Hemmung ist aber von der Pantothenatkonzentration unabhängig. Auch aus diesen Versuchen ist ersichtlich, dass hohe Salicylatkonzentrationen die Bakteriumsentwicklung selbst bei Vorhandensein riesiger Pantothenatüber-

schüsse vollkommen verhindert. Ähnlich verhielten sich auch andere Morgan-Stämme, weshalb dieses Verhalten für den Mikroorganismus als typisch angesehen werden kann.

Die Ergebnisse obiger Versuche zusammenfassend lässt sich folgendes feststellen: 1. Mol/50—mol/10 und höhere Salicylatkonzentrationen hemmen das Bakteriumwachstum unabhängig von der Zusammensetzung des Nährbodens, von seinem Gehalt an Pantothen-säure und der Art des Bakteriums. Nur auf diese unspezifische Wirkung des Salicylats kann bei der Lebensmittelkonservierung gerechnet werden. 2. Ausser dieser unspezifischen hat das Salicylat auch eine spezifische Wirkung, die nur bei entsprechenden Versuchsbedingungen und gegenüber gewissen Bakterien zur Geltung kommt. Diese spezifische Wirkung wird durch die Pantothensäure behoben. Die spezifische Wirkung lässt sich im Falle von Bakterien, die nur bei Vorhandensein von exogener Pantothensäure gezüchtet werden können, nicht nachweisen. 3. Die spezifische Wirkung des Salicylats kann im Falle von Coli- und Proteusbazillen nur in sehr einfachen Nährböden nachgewiesen werden, also unter Bedingungen, bei denen die Entwicklung — die Plasmasynthese — dem Fermentsystem des Bakteriums eine sehr grosse Aufgabe auferlegt. Werden diese Nährböden mit Aminosäuren versetzt, so nimmt die spezifische Salicylatwirkung entsprechend der Art der Aminosäure ab, oder sie hört vollkommen auf. Sonach hat die Mischung der entsprechenden Aminosäuren dieselbe Wirkung zur Folge wie die Pantothensäure, nur mit dem Unterschied, dass erheblich geringere Mengen von Pantothensäure hinreichen.

### 3. Ist die Wirkung charakteristisch für das Salicylatmolekül?

Kennzeichnend für die eigenartige bakteriostatische Wirkung des Salicylats ist der Umstand, dass sie von einem in den B<sub>2</sub>-Komplex gehörenden Vitamin, der Pantothensäure, behoben wird. Dies erinnert in vieler Hinsicht an die Eigenschaft der Sulfanilamide, wo aber die Interferenz von einem anderen Vitamin, der p-Aminobenzoesäure, hervorgerufen wird. Beide Verbindungen — Salicylat und Sulfanilamid — sind einfache Benzolderivate. Der Unterschied liegt zum Teil in den Substituenten, zum Teil in ihrer Stellung. Das Salicylat ist ein ortho-Benzolderivat, während das Sulfanilamid und die ähnlich wirkenden schwefelfreien Verbindungen (p-Nitrobenzoesäure, 4,4'-Diaminodibenzil, s. auch Kap. IV) ausnahmslos para-Derivate sind. Nun erheben sich zwei Fragen: Ist die Salicylatwirkung für die Struktur des Moleküls charakteristisch? Gibt es ein einfaches Benzolderivat, das beide Wirkungsarten aufweist?

Zur Entscheidung dieser Fragen wurde die bakteriostatische Wirksamkeit verschiedener Benzolderivate im Caseinnährboden gegen Staphylococcus aureus studiert, wobei darauf geachtet wurde, ob die bakteriostatische Wirkung von der p-Aminobenzoesäure oder der Pantothensäure behoben wird. Die Ergebnisse sind Tabelle 36. veranschaulicht.

Auf Grund dieser und anderer, hier ausführlich nicht zu besprechenden Ergebnisse lässt sich über dieses Problem folgendes sagen:



Tabelle 36.

*Die antagonistische Wirkung (Interferenz) der Pantothersäure  
und p-Aminobenzoessäure auf verschiedene Benzolderivate.*

Nährboden: Caseinhydrolysat. Stamm: Staphylococcus aureus B.  
(Ergebnisse des 24-Stunden-Versuchs.)

| Verbindung  | Bakteriostatischer<br>Titer. mol konz. | Interferenz     |                              |
|---|--|-----------------|------------------------------|
|   |  | Pant.-<br>säure | p-Amino-<br>benzoe-<br>säure |
| Phenol  | 1/100                                  | —               | —                            |
| o-Oxytoluol (o-Kresol)                                | 1/200                                  | —               | —                            |
| 1-Methyl-3-Oxy-4-Isopropylbenzol<br>(Thymol)          | 1/1.000                                | —               | —                            |
| o-Dihydroxybenzol (Brenzkatechin)                     | 1/80.000                               | —               | —                            |
| m-Dihydroxybenzol (Resorzin)                          | 1/50                                   | —               | —                            |
| p-Dihydroxybenzol (Hydrochinon)                       | 1/165.000                              | —               | —                            |
| p-Aminophenol   | 1/90.000                               | —               | —                            |
| m-Nitrophenol   | 1/300                                  | —               | —                            |
| p-Nitrophenol   | 1/390                                  | —               | —                            |
| α-Dinitrophenol                                       | 1/1.690                                | —               | —                            |
| γ-Dinitrophenol                                       | 1/1.600                                | —               | —                            |
| Natriumbenzoat  | 1/25—45                                | (+)             | (+)                          |
| Natriumsalizylat                                      | 1/1.200                                | +               | —                            |
| Natriumazetylsalizylat*                               | 1/1.000                                | +               | —                            |
| Salizylsäurephenylester (Salol)                       | ung. 1/20.000                          | +               | —                            |
| Salizylsäureamid                                      | 1/100                                  | —               | —                            |
| Natriumthiosalizylat                                  | 1/50                                   | —               | —                            |
| p-Oxybenzoessäureäthylester                           | 1/250                                  | —               | —                            |
| p-nitrobenzoesaures Natrium                           | 1/5.000                                | (+)             | +                            |
| p-aminobenzolsulfosaures (Sulfanil-<br>säure) Natrium | 1/600                                  | —               | +                            |
| benzolsulfaminsaures Natrium                          | 1/50                                   | —               | —                            |
| p-Aminobenzolsulfamid                                 | 1/15.000                               | —               | +                            |
| Sulfamethylthiazol                                    | 1/350.000                              | —               | +                            |
| 4,4'-Diaminodiphenylsulfon                            | 1/123.000                              | —               | +                            |

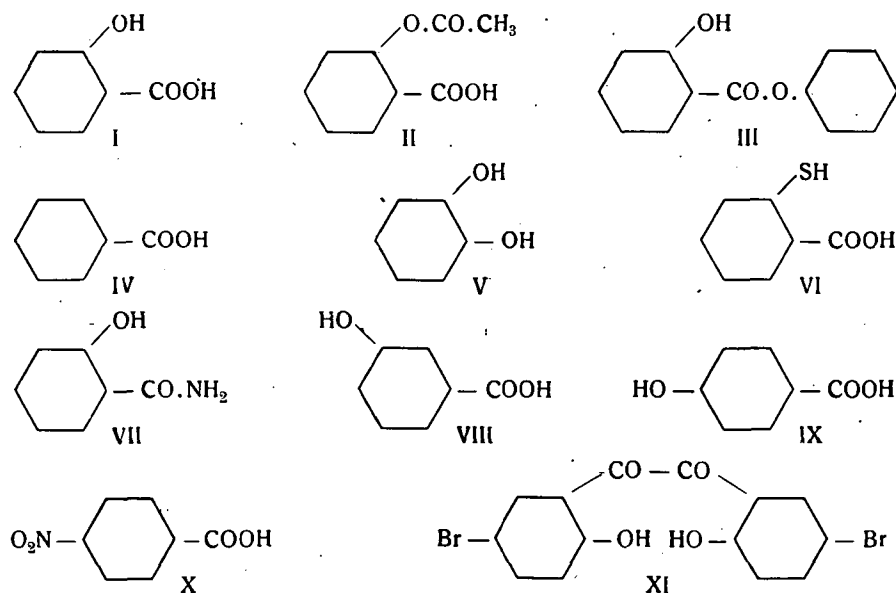
Erklärung:

- + = typische, auch bei sehr starker Verdünnung der Pantothersäure oder p-Aminobenzoessäure sehr deutlich in Erscheinung tretende Interferenz.  
 (+) = ungenaue Interferenzerscheinung (Einzelheiten s. im Text).  
 \* = die sorgfältig neutralisierte Azetylsalizylsäurelösung war nicht im Autoklav, sondern durch Erhitzen auf dem Wasserbad (5 min., 100°) sterilisiert worden.

Die Wirkung des Salicylats und der Sulfanilamide ist auffallend ähnlich, mit dem Unterschied, dass die Wirkung der einen Verbindung von der Pantothersäure, die der anderen von der p-Aminobenzoessäure behoben wird. Die Wirkung des Salicylats (I) ist derart typisch, dass eine ähnliche nur von seinen nächsten Derivaten, der Acetylsalizylsäure (II), und dem Phenylester, dem Salol (III) aufgezeigt wird. Die Wirkung der Benzoessäure (IV), richtiger die des Benzoats, war schon nicht charakteristisch. Im letzteren Fall berei-

tete der Umstand, dass die spezifische Wirkung des Benzoats wegen der schwachen Wirksamkeit der Verbindung kaum untersucht werden konnte, gewisse Schwierigkeiten. Seltsamerweise wurde selbst diese Wirkung unbestimmten Charakters von der p-Aminobenzoesäure aufgehoben. Vom Gesichtspunkte der Salicylatwirkung scheint nicht nur der Stellung der Substituenten eine Bedeutung zuzukommen: die bakteriostatische Wirkung des o-Dioxybenzols (V) und der Thiosalicylsäure (im Salicylsäuremolekül befindet sich ein Schwefelatom an Stelle des Sauerstoffes, (VI) wird von der Pantothenensäure nicht behoben. Auffallend war auch die Wirkungslosigkeit des Salicylsäureamids (VII). Für die Wichtigkeit der ortho-Stellung spricht der Umstand, dass die Salicylsäureisomere — die meta- (VIII) und para-Oxybenzoesäure (IX) — anders wirken. Eigentümlich verhält sich die p-Nitrobenzoesäure (X); die sulfanilamidähnliche Wirksamkeit dieser Verbindung ist bereits bekannt; ihre bakteriostatische Wirksamkeit wird aber gegenüber Staphylokokken in dem 24- oder 48stündigen Versuch von der Pantothenensäure behoben. Das Molekül scheint hinsichtlich Wirkungsmechanismus einen Übergang zwischen Salicylat und Sulfanilamid darzustellen. Es sei noch die interessante Tatsache erwähnt, dass die bakteriostatische Wirkung des kürzlich von *Kuhn, Birkofer* und *Möller*<sup>204</sup> hergestellt 5,5'-Dibromsalicils (XI), die gegen Staphylokokken selbst in der Verdünnung mol/250.000 zur Geltung kommt, weder durch Pantothenensäure noch durch p-Aminobenzoesäure vernichtet werden kann.

Sonach ist die antibiotische Wirkung des Salicylats für das Molekül höchst charakteristisch. Die Wirkung ist der der Sulfanilamide in vieler Hinsicht ähnlich. Der Unterschied besteht im wesentlichen darin, dass die Wirkung nicht von der p-Aminobenzoesäure sondern einem anderen Vitamin, der Pantothenensäure, neutralisiert wird. Die Beziehungen der Struktur zur Wirksamkeit sind aus den Strukturformeln der besprochenen Verbindungen zu ersehen.



#### 4. Wirkungsweise des Salicylat-Ions.

Um Missverständnissen vorzubeugen, sei noch einmal erwähnt, dass unsere obigen Versuche nicht mit freier Salicylsäure, sondern mit ihrer sorgfältig neutralisierten Lösung in einem nahezu neutralen Nährboden ausgeführt wurden; demnach dürfte die Wirkung nicht von der Salicylsäure selbst, sondern ihrem Anion, dem Salicylat-Ion bedingt worden sein. Mithin kommt eine Auslegung des Wirkungsmechanismus, die den Säurecharakter der Verbindung in Betracht zieht, nicht in Frage. Wie schon betont, wurden zweierlei Wirkungen beobachtet: die sich nur bei höheren Konzentrationen geltend machende unspezifische und die spezifische Wirkung. *Wir glauben, dass der unspezifischen Wirkung die vom Salicylat ausgeübte Eiweissdenaturierung zugrunde liegt.* Anson und Mirsky<sup>3</sup> haben nämlich 1934 gefunden, dass das Hämoglobin von 0,1—0,25 mol Salicylat denaturiert wird, die Koagulierung aber nicht zustande kommt: trotz der Denaturierung bleibt das Hämoglobin in Lösung. Der Grad der Eiweissdenaturierung ist um so grösser, je mehr Salicylationen die Lösung enthält. Die Denaturierung sei reversibel und das Hämoglobin gewinne seine ursprünglichen Eigenschaften nach Entfernung des Salicylats durch Dialyse wieder zurück. Best<sup>10</sup> konnte nachweisen, dass das Tabakmosaik-Virus von dem Natrium-salicylat in irreversibler Weise gefällt und das ein Nukleoproteid darstellende Virus von einer 0,46 mol Lösung endgültig denaturiert wird.

*Der von mir entdeckten spezifischen bakteriostatischen Wirkung des Salicylats, die von Pantothensäure in charakteristischer Weise behoben wird, lege ich auf Grund meiner Versuche die Hemmung der Pantothensäuresynthese zugrunde.* Folgende Beobachtungen, Versuche und Argumente sprechen für diese Auffassung.

Der erste und wichtigste Beweis ist die Tatsache, dass *die spezifische bakteriostatische Wirkung des Salicylats nur gegen die Mikroorganismen zur Geltung kommt, die ihren Pantothensäurebedarf in Wege einer Synthese selbst decken.* Im Falle des Streptococcus haemolyticus und des Morganbacillus konnte diese Wirkung nicht nachgewiesen werden; von beiden Mikroorganismen ist bekannt, dass sie nur in pantothensäurehaltigen Nährböden gezüchtet werden können. Auf Grund der bisherigen Ergebnisse kann schon angenommen werden — obwohl der experimentelle Beweis hierfür noch aussteht — dass die Pantothensäure für das Leben ebenso unentbehrlich ist wie z. B. das Vitamin B<sub>1</sub>. Die Zellen, die ohne exogene Pantothensäure entwicklungsfähig sind, stellen dieses Vitamin selbst her; dies gilt für die Pflanzen und auch für die meisten Bakterien. Diese Annahme erscheint um so mehr berechtigt, als das Vitamin in den Kulturen fast aller untersuchten Bakterien nachgewiesen werden konnte. So konnte ich z. B. das Vitamin in den Kulturen von Coli, Proteus, Staphylococcus, Paratyphus A, Paratyphus Breslau und Schottmüller, Typhus und zahlreichen verschiedenen Dysenteriestämmen (Flexner, Shiga, Sonne, Schmitz und New Castle), die in synthetischen oder Caseinhydrolysat-Nährböden wuchsen, nachweisen. Die Menge der Pantothensäure kann entsprechend den einzelnen Stämmen und dem Nährboden sehr wechselnd sein. 24 Stunden alte flüssige Kulturen enthalten ung. 0,04—0,4 γ pro ccm.



Bacillus nicht unerlässlich ist, da er auch bei Vorhandensein der  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethylbuttersäure, dieses Pantothersäurebausteins, gedeiht (im Versuch wurde das Lacton verwendet). Von dem  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethylbutyryl-lacton (kurz: Lacton) sind erheblich grössere erforderlich als vom Vitamin. Die Verhältnisse zeigt Tab. 37.

Tabelle 37.

*Beeinflussung des Wachstum des Morgan-Bacillus durch Pantothersäure bzw. ihrer Bausteine.*

| Konzentration des akzessorischen Stoffes | Akzessorischer Stoff |        |                 |                          |
|--|----------------------|--------|-----------------|--------------------------|
|  | Pantothenat          | Lacton | $\beta$ -Alanin | Lacton + $\beta$ -Alanin |
| mol/2.10 <sup>3</sup> . . . . .          | 100                  | 97     | 0               | 100                      |
| mol/1.10 <sup>4</sup> . . . . .          | 100                  | 45     | 0               | 45                       |
| mol/2.10 <sup>5</sup> . . . . .          | 100                  | 10     | 0               | 17                       |
| mol/2.10 <sup>6</sup> . . . . .          | 100                  | 0      | 0               | 0                        |
| mol/2.10 <sup>7</sup> . . . . .          | 95                   | .      | .               | .                        |
| mol/2.10 <sup>8</sup> . . . . .          | 46                   | .      | .               | .                        |

Die Zahlen geben den Grad Wachstums in Prozenten an.

Aehnliche Verhältnisse wurden auch bei den anderen mit dem Morgan-Bacillus angestellten Versuchen gefunden. Im 24stündigen Versuch brauchten wir von Lacton das Zehntausendfache der Vitaminmenge, im 48stündigen aber schnitt das Lacton erheblich günstiger ab: vom Lacton war nur eine 100—1.000-mal stärkere Konzentration nötig als vom Vitamin. Der Grund hierfür liegt wahrscheinlich darin, dass die Bakterien in einen späteren Zeitpunkt schon mehr Gelegenheit zum Vitaminaufbau haben als in dem kurzdauernden Versuch. Die An- oder Abwesenheit des  $\beta$ -Alanins ist vom Gesichtspunkte der Ergebnisse aus belanglos, ein Zeichen dafür, dass das Bakterium seinen Bedarf an diesem Stoff vollkommen allein deckt.

Auf Grund dieser Versuche ist schon klar zu sehen, warum der Morgan-Bacillus seinen Pantothersäurebedarf nicht allein zu decken vermag. *Die Wirkung der Pantothersäure kann durch das Lacton ersetzt werden; dies bedeutet, dass die Zelle nur diese Verbindung nicht zu synthetisieren vermag, während sie den anderen Baustein, das  $\beta$ -Alanin, ohne besondere Schwierigkeiten herstellt.* Überdies hat die Zelle die Fähigkeit, diese Bausteine zu einem Vitamin zu verkuppeln. So wird erklärlich, warum das Salicylat auf den Morgan-Bacillus nicht spezifisch wirkt: wahrscheinlich darum, weil *es die Zelle nicht angreifen kann; der Angriffspunkt des Salicylats ist ceteris paribus das die Dioxysocaprönsäure synthetisierende Fermentsystem.* Für diese Annahme spricht ferner der Umstand, dass die mit Salicylat vergiftete Coli- oder Staphylococcuskultur nicht nur von der Pantothersäure sondern auch von der Dioxysocaprönsäure bzw. ihrem Lacton zur Entwicklung veranlasst werden kann. Somit kann die vom Gesichtspunkt des Wachstums aus fehlende Fermenttätigkeit mit dem Produkt ersetzt werden. Selbst-

rendend ist von dem Lacton eine grössere Menge erforderlich als vom Vitamin. Diese Verhältnisse werden durch einen Versuch mit Colibazillen veranschaulicht (Tab. 38.).

Tabelle 38.

*Das Wachstum des Colibacillus auf dem Mol/400-Natriumsalicylat enthaltenden synthetischen Nährboden\* in Gegenwart von Pantothensäure und ihrer Bausteine.*

| Akzessorischer Stoff    | Wachstum   |                     |                                |                    |
|-------------------------|------------|---------------------|--------------------------------|--------------------|
|                         | bei Lacton | bei $\beta$ -Alanin | bei Lacton + $\beta$ -Alanin** | bei Pantothensäure |
| mol/10 <sup>3</sup>     | +++        | —                   | +++                            | —                  |
| mol/5.10 <sup>3</sup>   | ++         | —                   | —                              | .                  |
| mol/10 <sup>4</sup>     | —          | —                   | —                              | .                  |
| mol/10 <sup>7</sup>     | ***        | .                   | .                              | +++                |
| mol/3,3.10 <sup>7</sup> | .          | .                   | .                              | +++                |
| mol/5.10 <sup>7</sup>   | .          | .                   | .                              | —                  |

\* Der Nährboden enthält ausser der Stammnährflüssigkeit auch 0,2 mg Glykokoll in je Kubikzentimeter.

\*\* Verdünnung der Mischung der Lacton- und  $\beta$ -Alaninlösung zu gleichen Teilen.

\*\*\* = nicht untersucht.

Wie ersichtlich, leidet der Colibacillus bei Vorhandensein des Salicylats ebenso unter dem Mangel an Pantothensäure wie der Morgan-Bacillus (s. Tab. 37.). In beiden Fällen fehlt es an der Synthese von Dioxysocaprönsäure. Ähnliche Beobachtungen wie in der vorigen Tabelle machten wir auch in unseren Staphylokokkenversuchen.

Vor kurzem fanden wir, in der Gemeinschaft von *Eöllös*,<sup>170</sup> einen neuen Beweis dafür, dass es bei der spezifischen Salicylatwirkung auf die Hemmung der Dioxysocaprönsäuresynthese ankommt. Als die Pantothensäureproduktion des Dysenteriebacillus studiert wurde, haben wir anlässlich der Untersuchung meiner Sammlung unter zahlreichen Stämmen einige gefunden, die sich nur bei Vorhandensein von exogener Pantothensäure entwickelten. Mit den Einzelheiten dieser Frage befassen wir uns an anderer Stelle, hier möchten wir nur die Beobachtungen mit einem Schmitz-Stamm besprechen. Dieser vor einigen Jahren isolierte Stamm entwickelte sich im Caseinnährboden nur nach Hinzufügung von Pantothensäure oder  $\beta$ -Alanin. Die Daten sind aus Tab. 39. ersichtlich.

Demnach stellt dieser Stamm die Dioxysocaprönsäure selbst her, zur Synthese des  $\beta$ -Alanins aber ist er unfähig. Dass das  $\beta$ -Alanin ähnlich wie die Pantothensäure wirkt, geht aus der Tatsache hervor, dass im Filtrat der bei Vorhandensein von  $\beta$ -Alanin entwickelten Kultur Pantothensäure nachgewiesen werden konnte. Die Menge des erzeugten Vitamins war dem des hinzugefügten  $\beta$ -Alanins proportional. Im Caseinnährboden wurden im Falle einer  $\beta$ -Alanin-Konzentration von mol/20.000 0,227  $\gamma$ , nach mol/400.000  $\beta$ -Alanin 0,102  $\gamma$

Tabelle 39.

*Wachstum eines pantothensäuredefizienten Dysenterie Schmitz-Stammes im Caseinnährboden in der Anwesenheit der Pantothen-säure bzw. ihrer Bausteine.*

Inoculumgröße: ung. 5000 Bazillen.

| Konz. der accessoirischen Substanz | accessorische Substanz |                 |        |                        |
|------------------------------------|------------------------|-----------------|--------|------------------------|
|                                    | Pantothens.            | $\beta$ -Alanin | Lacton | $\beta$ -Alanin+Lacton |
| mol. $10^{-3}$                     | +++                    | +++             | —      | +++                    |
| mol. $10^{-4}$                     | +++                    | +++             | —      | +++                    |
| mol. $10^{-5}$                     | +++                    | +++             | —      | +++                    |
| mol. $10^{-6}$                     | +++                    | +               | —      | +                      |
| mol. $10^{-8}$                     | ++                     | —               | —      | —                      |
| mol. $10^{-9}$                     | —                      | —               | —      | —                      |

Die Kreuze geben den Grad des Wachstums an.

Pantothensäure gefunden. Wenn also der Schmitz-Stamm das  $\beta$ -Alanin nicht synthetisieren kann, hätte die Entwicklung dieses Stammes — obwohl er Pantothensäure allein nicht erzeugt — vom Salicylat in spezifischer Weise gehemmt werden müssen. Die Richtigkeit dieser Annahme wurde dadurch erwiesen, dass das Wachstum des Stammes im Caseinnährboden, unabhängig von der Menge des hinzugegebenen  $\beta$ -Alanins, vom Salicylat nach 24 Stunden bis zur Verdünnung mol/5.000, nach 48 Stunden bis mol/1.600 gehemmt wurde. Die Spezifität dieser Wirkung kann nicht bezweifelt werden, da die Entwicklungshemmung von der Pantothensäure und vom Lacton gleichweise behoben wurde (s. Tab. 40.).

Tabelle 40.

*Wirkung der Pantothensäure und des entsprechenden Lactons im Falle eines mit Natriumsalicylat vergifteten Schmitz-Stammes.*

Der Caseinnährboden enthielt mol/200 Natriumsalicylat und mol.  $10^{-4}$   $\beta$ -Alanin.

Inoculumgröße: ung. 4000 Bazillen.

| Konz. der accessoirischen Substanz | accessorische Substanz |        |                  |
|------------------------------------|------------------------|--------|------------------|
|                                    | Pantothens.            | Lacton | $\beta$ -Alanin* |
| mol. $10^{-3}$ .                   | n. u.                  | +++    | —                |
| mol. $10^{-4}$                     | n. u.                  | +      | —                |
| mol. $10^{-5}$                     | +++                    | —      | n. u.            |
| mol. $10^{-7}$                     | +++                    | —      | n. u.            |
| mol. $10^{-8}$                     | —                      | n. u.  | n. u.            |

\* die über die hinzugegebene Menge eingemessene Konzentration.

n. u. = nicht untersucht

Die Kreuze geben den Grad des Wachstums an.

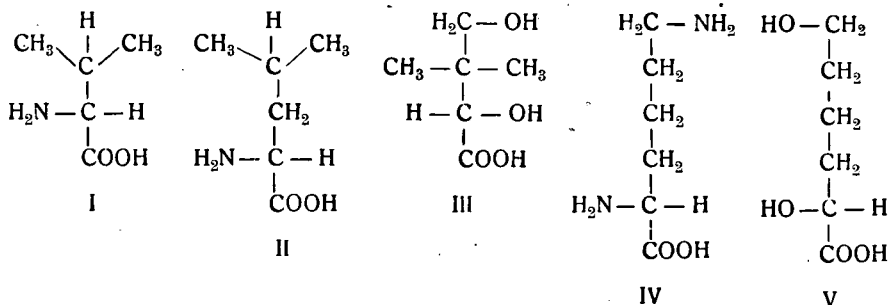
In Zusammenhang mit der Salicylatwirkung ist noch eine Frage zu klären: warum wird das Wachstum der Coli- und Proteusbazillen

vom Salicylat nicht spezifisch gehemmt, wenn diese Wirkung in einer aminosäurehaltigen Umgebung untersucht wird? In der Glucose-Ammoniumsalznährlösung werden sämtliche zum Plasmaaufbau erforderlichen Aminosäuren von dem Coli- und Proteusbacillus selbst hergestellt, was von der Zelle eine weit reichende Fermenttätigkeit erfordert. Von den Fermentsystemen, die bei der Durchführung dieser Aufgabe den Bakterien zur Verfügung stehen, ist gegenwärtig wenig bekannt. Ebenso wenig sind die Fermente bekannt, die zur Deckung des Pantothen säurebedarfes beitragen. Nach Kuhn und Wieland<sup>202</sup> wird der eine Baustein des Vitamins, die  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethylbuttersäure aus Valin gewonnen. Auch unsere Beobachtungen sprechen dafür, dass die Pantothen säuresynthese auf dem Wege über Aminosäure erfolge. Sonach ginge der Synthese der Pantothen säure eine Aminosäuresynthese voran, d. i. die im Gemisch Glucose-Ammonsalz wachsenden Colibazillen müssten zunächst die entsprechenden Aminosäuren bzw. ihre Gerüste aufbauen, erst nachher könne es zur Synthese der Pantothen säure kommen. Hierfür spricht, dass bei Vorhandensein von Methionin eine stärkere Salicylatinterferenz besonders durch Valin, Leucin und Lysin hervorgerufen wird, offensichtlich darum, weil in ihrer Anwesenheit die Bedingungen der Pantothen säuresynthese einfacher sind. Das Gerüst des Valin (I) und des Leucin (II) ist dem der  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethylbuttersäure (III) in vieler Hinsicht ähnlich und es ist wahrscheinlich, dass zum Aufbau der letzteren Verbindung die erwähnten Aminosäuren sehr gut verwendet werden können. Das Lysin war vom vorerwähnten Gesichtspunkt aus ebenfalls sehr wirksam, obwohl sein Gerüst von dem der erwähnten Aminosäuren wesentlich abweicht. Es ist jedoch denkbar, dass das Lysin (IV) nicht in der Pantothen säuresynthese, sondern im Aufbau ihres Isomers, der „Nor-Pantothen säure“, eine Rolle spiele, in deren Molekül der Platz der  $\alpha,\gamma$ -Dioxyisocapro nsäure von der  $\alpha,\epsilon$ -Dioxycapro nsäure (V) eingenommen wird. Letztere Verbindung entsteht leicht aus dem Lysin im Verlauf der häufigen oxydativen Desaminierung, wodurch auch die Entstehung der „Nor-Pantothen säure“ möglich ist. Vorläufig ist experimentell nur so viel bewiesen (Woolley und Hutchings,<sup>394</sup> Subbarow und Rane<sup>353</sup>), dass die Wirkung der „Nor-Pantothen säure“ mit der der natürlichen identisch ist, ihr Vorkommen in der Natur aber wurde bisher durch nichts belegt. Wir vermuten, dass die Bakterien als Abwehr gegen die salicylatbedingte Hemmung ihrer Fermentfunktionen zur Sicherung ihres Stoffwechsels gelegentlich auch „Nor-Pantothen säure“ synthetisieren können. Ansonst sind die Bedingungen der Pantothen säuresynthese im Caseinnährboden viel günstiger als in dem Glucose-Ammonsalzgemisch; dies erhellt aus einem unserer Versuche, wo der Colibacillus in 24 Stunden im ersten Nährboden 0,320  $\gamma$ , im anderen nur 0,043  $\gamma$  Pantothen säure pro ccm Nährboden erzeugte. Es sei bemerkt, dass dieser Unterschied durch die bessere Entwicklung der Bazillen im Caseinnährboden nicht erklärt werden kann, da in der Caseinkultur bloss um 20% mehr Bakterien gefunden wurden als in dem synthetischen Nährboden.

Obige Ausführungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:  
*Die spezifische bakteriostatische Wirkung des Salicylats findet auf dem Wege über die Hemmung der Pantothen säuresynthese statt,*



indem das Fermentsystem, von dem der eine Baustein der Pantothen-säure, die  $\alpha,\gamma$ -Dioxy- $\beta,\beta$ -dimethylbuttersäure, synthetisiert wird, unter der Salicylatwirkung eine Schädigung erleidet. Dieses Ferment-system hat anscheinend enge Beziehungen zum intermediären Stoff-wechsel der Aminosäuren, weshalb die Salicylatwirkung im weiteren Sinne des Begriffes als eine Störung dieses intermediären Stoff-wechsels aufgefasst werden kann.



## 2. Ist das Salicylat ein echtes Chemotherapeuticum?

Es dürfte belanglos sein, wer das Salicylat zum ersten Male als Antirheumaticum verwendet hat. Soviel steht fest, dass das Mittel seit über fünfzig Jahren gegen Polyarthrits verordnet wird. Einige Lehrbücher erwähnen die Salicylsäure wegen ihrer anti-rheumatischen Wirkung in der Gruppe der Chemotherapeutica. Es ist aber fraglich, ob die Verbindung diesen Namen zu tragen berechtigt ist. Chemotherapeuticum ist ein Arzneimittel, das auf den Erreger bzw. die Ursache einer Krankheit spezifisch wirkt. Im folgenden werden wir prüfen, ob das Salicylat dieser Forderung gerecht wird.

Oben wurde gezeigt, dass das Salicylatmolekül auf einzelne Bakterien spezifisch wirkt. Dennoch ist die Antwort auf obige Frage schwer, da die Aetiologie des akuten Gelenkrheumatismus — obschon seine infektiöse Herkunft kaum bezweifelt werden kann — nicht sicher bekannt ist. Wir sind nun gezwungen, die Frage einer Analyse zu unterziehen, ohne in Bezug auf den Erreger oder die Aetiologie Stellung zu nehmen.

Wir haben gezeigt, dass das Salicylat auf die Bakterien zweierlei Wirkung ausübt: seine unspezifische Wirkung ist unbedeutend, die nur bei höheren Konzentrationen (cca bei mol/10—mol/50) zur Geltung kommt, während seine spezifische Wirkung sich entsprechend dem Milieu und der Bakteriumart ändert. Der unspezifischen Wirkung ist beim Lebenden keine Rechnung zu tragen; mindestens eine Konzentration von 250 mg % wäre im Organismus erforderlich, um diese Wirkung zur Geltung kommen zu lassen. Diese Konzentration wird aber selbst dann nicht erzielt, wenn das Mittel sich am Ort der Erkrankung gewissermassen ansammelt. Mithin kommt für die Chemotherapie nur die spezifische Wirkung des Salicylats in Betracht.

Zweifelsohne erinnert die spezifische Salicylatwirkung in vieler Hinsicht an die des Sulfanilamid. In beiden Fällen ist die Wirkung

kennzeichnend für das Molekül. Von diesem Gesichtspunkt aus ist das Salicylat vielleicht noch mehr spezifisch als das Sulfanilamid. Das Beiwort „spezifisch“ trifft für das Salicylat zu, dennoch ist es nicht bestimmt, ob die Verbindung auf den Erreger des Rheumatismus wirkt. Die spezifische bakteriostatische Wirksamkeit der Verbindung hängt, wie schon des öfteren betont, von der Bakteriumart und dem Milieu ab. Angenommen, dass der akute Gelenkrheumatismus vom Streptococcus hervorgerufen wird, so darf die Tatsache, keineswegs ausser acht gelassen werden, dass der Coccus im kranken Gelenke nie gefunden wurde. Abgesehen davon kommt eine direkte Wirkung des Salicylats auf die Streptokokkeninfektion schon deshalb nicht in Frage, weil dieser Coccus seinen Pantothen säurebedarf auf exogenem Wege beschafft; das Salicylat kann hier keinen Angriffspunkt haben. Nun glaubt man aber heute nicht mehr, dass der akute Gelenkrheumatismus eine Streptokokkeninfektion der Gelenke darstelle; es wird angenommen, dass die Entzündung der Synovialmembran durch ein Toxin des Coccus oder durch die infolge der Infektion entstandene Allergie bedingt sei.

Angenommen, dass das Salicylat — wie es von den meisten Klinikern behauptet wird — gegen die akute Polyarthrit is spezifisch wirke, kann die Wirkung durch die auf die Erreger gerichteten antibiotischen Eigenschaften des Präparates doch nicht erklärt werden. Nun bleibt nichts anderes übrig, als anzunehmen, dass die spezifische Wirkung an der kranken Synovialmembran zustande kommt, indem ihr pathologischer Prozess irgendwie in günstigem Sinne beeinflusst wird. Leider sind wir hierdurch wieder auf ein unbekanntes Gebiet geraten, denn über die Unterschiede zwischen dem Intermediärstoffwechsel der kranken und dem der normalen Synovialmembran weiss man wieder nichts. Anscheinend kommt es im Laufe der rheumatischen Infektion auch zu Aenderung des Intermediärstoffwechsels. *Kapp* und *Coburn*<sup>181</sup> fanden im Urin von Rheumatikern einen Koproporphyrinisomer, der bei gesunden nie gefunden wurde. Merkwürdigerweise tritt die Koproporphyrinurie gleichzeitig mit dem rheumatischen Zustand auf, bei der einleitenden Tonsillitis ist sie noch nicht vorhanden. Diese Tatsache sagt noch recht wenig darüber, dass der Intermediärstoffwechsel der kranken Synovialmembran von dem der gesunden abweicht. Wenn wir aber annehmen, dass bei dem Rheumatismus nicht nur entzündliche Gefässveränderungen auftreten sondern auch eine primäre Schädigung der Synovialzellen vorliegt, glauben wir der Wirklichkeit einen Schritt näher gekommen zu sein. *Wir glauben, dass bei der rheumatischen Polyarthrit is der Intermediärstoffwechsel der Synovialmembran krankhaft verändert ist und die günstige Wirkung des Salicylats im Wege dieser Vorgänge zur Geltung kommt.* Bei Bakterien äussert sich die spezifische Salicylatwirkung in der Hemmung der Pantothen säuresynthese; dieser Prozess scheint aber mit dem Intermediärstoffwechsel der Aminosäuren eng zusammenzuhängen. Vorläufig wissen wir nicht, auf welche Fermentsysteme das Salicylat spezifisch einwirkt, es scheint aber auf Grund der bisherigen Beobachtungen, dass verschiedene Fermente behindert werden können. Auf Grund der Literaturangaben haben wir versucht, diese Beobachtung mit unserer Theorie in Einklang zu bringen.

*Klein* und *Kamin*<sup>192</sup> haben gefunden, dass die d-aminosäureoxydierende Fähigkeit der gereinigten d-Aminosäureoxydase-Präparate der Rattenleber und -niere von der Benzoesäure selbst in stark verdünnten Lösungen (mol 0,01—0,001) gehemmt wird. Dieser reversible Hemmungseffekt der Benzoesäure hängt auch von der Menge der als Substrat dienenden Aminosäure ab, das Ausmass der Hemmung aber wird vom Verhältnis Aminosäure: Benzoat bestimmt. Ausgehend von dieser Tatsache nehmen die Verfasser an, dass das Benzoat mit dem Ferment einen Komplex bilde und hierdurch die Oxydation der Aminosäure hindere. Das Wesen der Wirkung bestehe darin, dass das Benzoat d-Aminosäure von dem Ferment in einem dem Massenwirkungsgesetz entsprechendem Grade verdränge. Die ortho- und meta-Aminobenzoessäure, Salicylsäure, meta-Hydroxybenzoessäure sind nur  $\frac{1}{3}$ — $\frac{1}{4}$  so wirksam wie die Benzoesäure, demnach wirkt in dieser Hinsicht die Benzoesäure energischer als die mit ihr verwandten Verbindungen. Diese Erscheinung ist also weniger spezifisch als die von mir entdeckte Salicylatwirkung. Mit Rücksicht hierauf sind wir der Ansicht, dass es sich nicht um identische Wirkungen handle. In diesem Zusammenhang sei die von *Bernheim*<sup>17, 18</sup> 1940 veröffentlichte interessante und wichtige Beobachtung erwähnt, dass sich der Tuberkelbacillus im Warburgschen Apparat anders benimmt als die Bakterien im allgemeinen: seine Atmung wird von Aminosäuren, Kohlehydraten oder Oxysäuren nicht gesteigert. Fügt man aber der Suspension ganz kleine Salicylatmengen zu, so steigt der Sauerstoffverbrauch bedeutend an, weil die Zellen das Salicylat verbrennen. Dieses Verhalten des Salicylats ist ganz spezifisch; die Oxydation wird durch Benzoesäure schwach, durch andere verwandte Verbindungen, wie z. B. p- und m-Hydroxybenzoessäure, überhaupt nicht erhöht. Die Spezifität dieser Wirkung lässt schon eine Analogie mit der von uns beobachteten Wirkung vermuten. Im Sinne der Fermentkinetik kann die Oxydation des Salicylats nur in der Weise erfolgen, dass das entsprechende Ferment des Tuberkelbacillus, das das Salicylat oxydiert, mit dem Substrat in eine spezifische Bindung tritt, also ein entsprechender Ferment-Salicylat-Komplex entsteht. Vorläufig haben wir noch keine experimentellen Beweise, es hat aber den Anschein, dass dasselbe oder ein ähnliches Ferment auch in anderen Bakterien vorhanden ist, das hier — aus vorläufig unbekannten Gründen — das Salicylat nicht zu oxydiern vermag, wodurch der Komplex unverändert bleibt und das Ferment mit dem entsprechenden im Verlauf der Zelltätigkeit entstandenen Intermediärs substrat sich nicht vereinigen kann, was eine eigentümliche Hemmung des intermediären Zellstoffwechsels zur Folge hat. Kürzlich wurde die Salicylatwirkung von *Euler* und *Ahlström*<sup>90, 91</sup> an verschiedenen Fermentsystemen studiert. Sie haben festgestellt, dass das Salicylat auf die Lactico-Dehydrase, Apozymase und Aethiozymase hemmend wirkt. Sehr interessant ist auch die Beobachtung dieser Verfasser, dass im Blute der mit Salicylat behandelten Ratten die Menge der Brenztraubensäure auf das zweifache der normalen ansteigt. Ferner haben sie gefunden, dass die Haare der mit Salicylat anhaltend behandelten schwarzen Ratten bräunlich verfärbt wird. Demnach wirke das Salicylat auch auf die Melaninbildung; da die Melaninbildung im Rahmen des

Eiweiss-Intermediärstoffwechsels vor sich geht, lässt sich diese Beobachtung im Sinne unserer Auffassung auswerten.

Auf Grund des Gesagten soll unsere Auffassung in Bezug auf die „chemotherapeutische“ Wirkung des Salicylats im folgenden zusammengefasst werden: Das Salicylat kann nicht im Sinne der Ehrlichschen Begriffsbestimmung als ein Chemotherapeuticum angesehen werden, obwohl es auf gewisse Krankheitserreger in kennzeichnender Weise, in vieler Hinsicht ähnlich dem Sulfanilamid, wirkt. Seine Wirkung ist zu schwach, um sich in Organismus geltend machen zu können. Seine spezifische Wirkung kommt selbst in vitro nur gegenüber einem Teil der Mikroorganismen zur Geltung, auf die anderen, wie z. B. auf den Streptococcus, hat das Salicylat keine Wirkung. Seine antirheumatische Wirksamkeit hat mit dem Erreger kaum etwas zu tun, und wir sind der Ansicht, dass seiner Heilwirkung eine Wirkung auf die entzündeten Gewebe, wahrscheinlich die günstige Beeinflussung des krankhaften intermediären Eiweissstoffwechsels der Synovialmembran, zugrunde liegt.

#### IX. Kapitel.

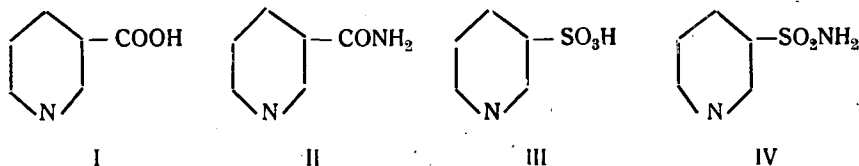
### Über die sogenannten Antivitamine.

Mit der Entdeckung des Wirkungsmechanismus der Sulfanilamide ergaben sich enge Beziehungen zwischen den Problemen der Chemotherapie und des intermediären Bakteriumstoffwechsels. Früher hatte man von der Wirkungsweise der antibakteriellen Arzneimittel nur unklare Kenntnisse; die antibiotischen Eigenschaften wurden mit dem Begriff „Protoplasmagift“ bezeichnet. Es ist schwer zu sagen, was der nähere Sinn dieser Bezeichnung war, so viel steht aber fest, dass man darunter nicht eine spezifische, sondern eine allgemeine, wahrscheinlich auf Denaturierung des ganzen Protoplasmas gerichtete Wirkung verstand. Ausser den Sulfanilamiden und dem Salicylat sind auch andere antibiotisch wirksame Stoffe bekannt, die die Bakterien streng spezifisch schädigen, d. h. auf das Plasma nicht gleichmässig einwirken, sondern nur seine gewissen Herde (Rezeptoren) beeinträchtigen. Obwohl zwischen der Sulfanilamid- und Salicylatwirkung eine gewisse Analogie besteht — da beide Mittel den Ausfall eines für den Intermediärstoffwechsel äusserst wichtigen Ergons bedingen — ist die Art, wie dieser Defekt zustande gebracht wird, wesentlich verschieden. Die durch das Sulfanilamid hervorgerufene Störung besteht in der *Verdrängung* der ihm strukturell nahe stehenden p-Aminobenzoesäure. Das Salicylat dagegen *verhindert die Bildung* der Pantothenensäure. Schliesslich und endlich führen beide Mittel zur Avitaminose der Bakterien, die aber *nicht im Bilde eines Vitaminmangels sondern als Folge einer entgegengesetzten Wirkung auftritt; es handelt sich also nicht um ein Avitaminose, sondern eine Antivitaminose*. Die antibakteriell wirksamen Stoffe, die zu ähnlichen Zuständen Anlass geben, werden heute im allgemeinen Antivitamine genannt. Ausser den Sulfanilamiden und dem Salicylat sind auch andere Antivitamine bekannt.

Obwohl diese Stoffe in der Gruppe der Chemotherapeutica besprochen werden (*Kuhn*,<sup>200</sup> *McIlwain*,<sup>245</sup> *Staub*<sup>347</sup>), weiss man von ihrer therapeutischen Wirksamkeit nichts. Dennoch ist es nicht ausgeschlossen, dass die Kenntnis der Antivitamine zur Entwicklung der Chemotherapie nicht nur theoretisch sondern auch praktisch in bedeutendem Masse beitragen wird.

### 1. Die sulfosauren Analogen der Nikotinsäure bzw. des Nikotin-säurenamids.

Nach *McIlwain*<sup>240</sup> haben die Nikotinsäure (I) bzw. ihr Amid (II) und ihre sulfosauren Analogen bzw. die Pyridin- $\beta$ -sulfonsäure (III) bzw. das Pyridin- $\beta$ -sulfonsäureamid (IV) eine entgegengesetzte Wirkung.



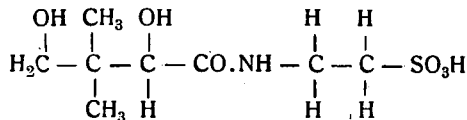
Während die Carbonsäuren (I, II) Wachstumsstoffe sind, wirken die Sulfosäuren hemmend auf die Entwicklung der Bakterien. Die mol/100 Sulfosäurekonzentration wirkt schon hemmend auf die Staphylokokken; allerdings hänge die Hemmung nicht nur vom Nikotinsäureamidgehalt des Nährbodens sondern auch von der Züchtungszeit ab. Die beobachtete Hemmung sei vorübergehenden Charakters, sie höre am 3.—4. Tage auf. Er beobachtete die durch die Sulfonsäure bedingte Hemmung nicht nur gegen die Staphylokokken sondern in einem geringeren Grade auch gegen die Proteusbazillen. Das Wachstum der Proteusbazillen wurde auch dann gehemmt, wenn als Wachstumsstoff Cozymase verwendet wurde. Dagegen wurde das Wachstum der exogenen Nikotinsäure nicht beanspruchenden Colibazillen von der Sulfonsäure keineswegs beeinflusst. Die Beobachtungen *McIlwains* wurden nicht in jedem Punkt erhärtet: so konnten *Matti*<sup>205</sup> und seine Mitarbeiter im Falle von Coli- und Proteusbazillen, ferner *Polytomella caeca*, keine Wachstumshemmung beobachten. Auch die Versuche von *Möller* und *Birkofer*<sup>280</sup> sprechen dafür, dass die Entwicklung des *Proteus* von der Sulfonsäure bzw. ihrem Amid nicht gehemmt wird. Interessanterweise üben diese Stoffe auch auf die Entwicklung des *Streptobacterium plantarum* selbst in beträchtlichen Verdünnungen ( $10^{-3}$ — $10^{-5}$  mol) eine Hemmung aus, diese wird aber nicht nur von der Nikotinsäure sondern auch von anderen Stoffen, z. B. von den Zink- und Ferri-Ionen aufgehoben. Im Gegensatz hierzu wurden die Ergebnisse von *McIlwain* von *Erlenmeyer*<sup>88, 89</sup> und seinen Mitarbeitern in jeder Beziehung bestätigt.

Demnach liefern die mit Pyridin- $\beta$ -sulfonsäure ausgeführten Versuche bei weitem nicht so übereinstimmende und auffallende Ergebnisse, wie die Sulfanilamidversuche. Die Wirkung ist schwach und vorübergehend. Wenn man aber bedenkt, dass die Nikotinsäure bloss einen Baustein der Codehydrase darstellt, die an dem inter-

mediären Stoffwechsel in primärer Weise nicht teilnimmt, so ist ihre schwache oder überhaupt mangelnde Wirksamkeit durchaus begreiflich. Darum würde es sich kaum lohnen, auf weitere Einzelheiten dieser Frage einzugehen, weshalb lediglich auf die zitierten Verfasser, vor allem *Möller* und *Birkofer*, verwiesen wird.

## 2. Sulfopantothensäure (Pantoyltaurin).

Die Bedeutung des Problems der Antivitamine erhellt ganz besonders aus der Tatsache, dass die biologischen Eigenschaften des der Pantothensäure entsprechenden Antivitamins — Sulfopantothensäure oder Pantoyltaurin — ungefähr zur gleichen Zeit in drei verschiedenen Forschungsstätten, unabhängig voneinander, entdeckt wurden. In chronologischer Reihe steht die Arbeit von *Kuhn, Wieland* und *Möllers*<sup>203</sup> an erster Stelle. Das sulfonsäure Analogon der Pantothensäure (s. S. 138) wird durch die Kondensation des entsprechenden Lactons und des Taurin hergestellt. Die Verbindung



unterscheidet sich von der Pantothensäure darin, dass die den Säurecharakter bestimmende Gruppe nicht von  $-\text{COOH}$  sondern von  $-\text{SO}_3\text{H}$  gebildet wird. Sonst haben die Moleküle die gleiche Struktur.

Infolge des asymmetrischen Kohlenstoffatoms sind zwei Isomere der Verbindung möglich, ebenso wie vom Vitamin (+) und (—) Isomere existieren. Es gelang *Kuhn* und seinen Mitarbeitern, die zwei Antipoden zu trennen und ihre biologische Wirksamkeit zu prüfen. Zur biologischen Untersuchung diente ein Milchsäurebakterium, das *Streptobacterium plantarum*. Dieser Mikroorganismus wurde von *Möller* und *Schwarz*<sup>281</sup> in einem chemisch definierten Nährboden gezüchtet, in dem der Pantothensäuregehalt des Nährbodens nach Belieben geändert werden konnte. In diesem Nährboden ist der Grad der Bakterientwicklung gewissermaßen dem Pantothensäuregehalt proportional. Als Wuchsstoff ist nur der rechtsdrehende Isomer (+) wirksam, die (—)-Pantothensäure ist vollkommen wirkungslos. *Die Sulfopantothensäure wirkt in entgegengesetztem Sinne wie das Vitamin, sie hindert die Bakterientwicklung.* Die optischen Antipoden weisen auch in diesem Fall ein unterschiedliches Verhalten auf; die (+)-Sulfopantothensäure hemmt, der Antipod ist unwirksam. Die hemmende Wirkung der Sulfopantothensäure hängt von dem Pantothensäuregehalt des Nährbodens ab, die durch die Sulfopantothensäure bedingte Bakteriostase wird von dem Vitamin behoben. Demnach wird das Ausmass der Entwicklung allein von dem Verhältnis des Wuchsstoffes (Pantothensäure) zum Hemmstoff (Sulfopantothensäure) bestimmt. Die Hälfte des maximalen Wachstums wurde im Falle des *Streptobacterium plantarum* von *Kuhn* und seinen Mitarbeitern gefunden, wenn Sulfonsäure und Vitamin sich wie 380:1 verhielten. Nach ihrer Auffassung komme der Pantothensäure als

Ferment nach Verkuppelung mit dem Apoferment im intermediären Stoffwechsel eine wichtige Rolle zu. Diese Auffassung stimmt mit den Ergebnissen von *Dorfman*, *Berkman* und *Stewart*<sup>81</sup> überein, die die wichtige Rolle der Pantothersäure in der Oxydation der Brenztraubensäure beobachtet haben. Das Vitamin werde von seinem eiweissartigen Träger durch das auch sterisch identisch aufgebaute Sulfopantothersäuremolekül verdrängt, der Synplex werde vom letzteren gebildet, ein Synplex, der die Fermentfunktion auszurichten nicht mehr imstande sei.

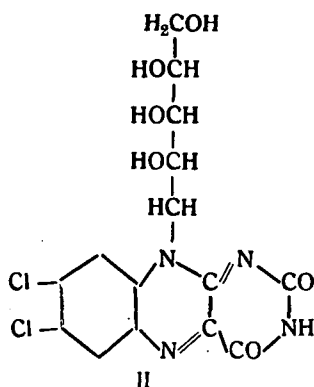
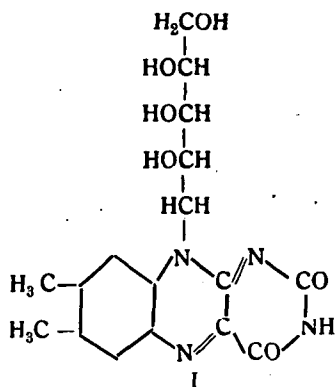
Englische Forscher machten ähnliche Beobachtungen wie *Kuhn* und seine Mitarbeiter. *Barnet* und *Robinson*<sup>8</sup> stellten (1942) die Sulfopantothersäure und mehrere Homologverbindungen derselben her, die dann von *McIlwain*<sup>241, 244</sup> geprüft wurden. Von diesen sollen nur die sulfonsauren Analogen, und zwar die Sulfopantothersäure (Pantoyltaurin), ihr Amid und das Homopantoyltaurin besprochen werden. Letztere Verbindung enthält ein Kohlenstoffatom mehr als das Pantoyltaurin. Alle drei Verbindungen haben die Eigenschaft gemein, dass sie die Entwicklung gewisser Bakterien hindern. Das wirksamste war das Pantoyltaurin; sein Amid wirkte vierzigmal, das Homopantoyltaurin viermal so schwach. Zur Behebung der Wirkung von 1 mol Pantothersäure waren vom Pantoyltaurin ungefähr 500 mol nötig, die Verhältnisse sind also ähnlich wie bei den Versuchen von *Kuhn* und seinen Mitarbeitern mit dem *Streptobacterium plantarum*. Die Verbindungen hemmten ausser den Streptokokken auch das Wachstum verschiedener Pneumococcustypen und einzelner Diphtheriestämmen, die Entwicklung der Coli- und Morganbazillen konnten sie hingegen nicht beeinflussen. Nach *McIlwain* sei die bakteriostatische Wirkung der Sulfopantothersäure auf die Streptokokken sehr energisch, so dass die Verbindung auch als Chemotherapeuticum in Betracht komme. Da die Gewebe die Pantothersäure ungefähr in der Konzentration  $2 \cdot 10^{-6}$  mol enthalten, wäre von der Sulfopantothersäure bei Streptococcusinfektionen eine mol  $10^{-3}$  Konzentration erforderlich, um wirksam zu sein. Da nun für die Maus g/kg der Sulfonsäure noch nicht toxisch wirkt, werden die therapeutisch notwendigen 0.25 g/kg wahrscheinlich anstandslos vertragen. Auf Grund dieser theoretischen Erwägungen ist *McIlwain* der Ansicht, dass es möglich sein wird das Pantoyltaurin künftig als Chemotherapeuticum anzuwenden.

Der Vollständigkeit halber sei noch erwähnt, dass *Snell*<sup>344</sup> die bakteriostatische Wirkung des Pantoyltaurins unabhängig von den erwähnten Verfassern entdeckte. Seine Beobachtungen stimmen mit den angeführten überein, sonach dürfte sich ihre Besprechung erübrigen.

### 3. Der Lactoflavinantagonist.

Die vorigen Beispiele, ferner der Wirkungsmechanismus des Sulfanilamid sprechen für die Annahme, dass die Sulfonsäuren, die strukturell einen Säurecharakter besitzenden Vitaminen entsprechen, die Vitaminwirkung aufheben. Kürzlich haben *Kuhn*, *Weygand* und *Möller*<sup>206</sup> bewiesen, dass nicht nur die Vitamine von Säurecharakter sondern auch die keine Carboxylgruppe tragenden Vitamine spezi-

fische Antagonisten haben können. Sie haben gefunden, dass die Bakteriumentwicklung von dem Dichloranalogen des Lactoflavin (I) dem 6,7-Dichlor-9-d-riboflavin (II) in spezifischer Weise gehemmt wird.



Die Verbindung hemmte die Entwicklung der Hefezellen, des *Staphylococcus aureus*, *Streptobacterium plantarum*, *Bac. lactis* und eines näher nicht genannten „Stuhlstammes“ selbst in beträchtlichen Verdünnungen. Die Hemmung erwies sich als reversibel; das Lactoflavin wirkte enthemmend. Die antagonistische Eigenschaft des Antivitamins war bedeutend, indem die Wirkung von 1 mol Lactoflavin — abhängig von dem Bakteriumstamm und der Versuchsdauer — von 25—280 mol Chlorderivat behoben wurde. *Kuhn* und seine Mitarbeiter erklären die entwicklungshemmende Wirkung des Chlorderivates mit der Annahme, dass das gelbe Ferment, das mit der reduzierten Form des 6,7-Dichlor-9-d-riboflavin gebildet wird, wegen seines höheren  $E_0$ -Wertes das  $O_2$  nicht zu  $H_2O$  zu reduzieren vermag.

(Abgeschlossen am 25 Januar 1944)



## Schrifttum.

|  | Zitiert auf Seite |
|--|-------------------|
| 1. <i>Abderhalden, R.</i> , Fermentforsch., 16: 435, 1942.   | 72                |
| 2. <i>Ansbacher, S.</i> , Science, 93: 164, 1941.  | 81                |
| 3. <i>Anson, M. L.</i> , und <i>Mirsky, A. E.</i> , J. gen. Phys., 17: 399, 1934.  | 137               |
| 4. <i>Arnold, H.</i> , <i>Helmert, E.</i> , <i>Möbus, Th.</i> , <i>Prigge, R.</i> , und <i>Wagner-Jauregg, Th.</i> , Ber. chem. Ges., 75: 369, 1942. | 33                |
| 5. <i>Auhagen, E.</i> , Zeitschr. f. phys. Chem., 274: 48, 1942; 277: 197, 1943.   | 56, 83            |
| 6. <i>Barlow, O. W.</i> , cit. <i>King, J. T.</i> , und <i>Henschel, A. T.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47: 400, 1941.                          | 83                |
| 7. — und <i>Homburger, E.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 43: 317, 1940.   | 25, 33            |
| 8. <i>Barnet, J. W.</i> , und <i>Robinson, F. A.</i> , Biochem. J., 36: 364, 1942; ref. Chem. Zbl. 1943 I, 1062.                                     | 148               |
| 9. <i>Barron, E. S. G.</i> , und <i>Jacobs, H. R.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 37: 10, 1937.  | 10, 64            |
| 10. <i>Bauer, E.</i> , und <i>Rüf, H.</i> , Helv. Chem. Acta, 25: 533, 1942.   | 81                |
| 11. <i>Bauer, H.</i> , J. Amer. chem. Soc., 61: 613, 1939.   | 115               |
| 12. —, Ibid., 61: 617, 1939.   | 115               |
| 13. —, und <i>Rosenthal, S. M.</i> , Pub. Health. Rep., 53: 40, 1938.  | 41, 113, 115      |
| 14. —, —, Ibid., 54: 2093, 1939.   | 82                |
| 15. <i>Bell und Roblin, J.</i> Amer. chem. Soc., 64: 2905, 1942; cit. <i>Klotz</i> <sup>184</sup>  | 104               |
| 16. <i>Benigno, P.</i> , Arch. f. exp. Path. u. Pharm., 199: 265, 1942.  | 109               |
| 17. <i>Berheim, F.</i> , Science, 92: 204, 1940.   | 145               |
| 18. —, J. biol. Chem., 143: 383, 1942.   | 145               |
| 19. <i>Best, J. R.</i> , Nature, 1940 I, 627.  | 137               |
| 20. <i>Bieter, R. N.</i> , <i>Larson, W. P.</i> , <i>Levine, M. L.</i> , und <i>Cranston, E. M.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41: 202, 1939.     | 41, 42            |
| 21. <i>Birkhaug, K. E.</i> , J. inf. Dis., 53: 250, 1933.  | 50                |
| 22. <i>Blanchard, K. C.</i> , J. biol. Chem., 140: 919, 1941.  | 80                |
| 23. <i>Blaschko, H.</i> , Biochem. J., 29: 2302, 1935.   | 69                |
| 24. <i>Blüss, E. A.</i> , und <i>Long, P. H.</i> , Bull. Hopkins Hosp., 60: 149, 1937.   | 10                |
| 25. —, —, J. Amer. Med. Ass., 109: 1524, 1937.   | 110               |
| 26. —, —, New England J. Med., 217: 18; cit. <i>Long und Blüss</i> <sup>231</sup>  | 118               |
| 27. —, —, IIIrd Int. Cong. Microbiol., 1939, Rep. Proc., p. 583.   | 70                |
| 28. —, <i>Ott, E.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 43: 706, 1940.   | 42                |
| 29. —, <i>Long, P. H.</i> , Bull. Hopkins Hosp., 69, 14, 1941; ref. Ber. ges. Phys., 130: 110, 1942.   | 77                |
| 30. <i>Bordás, A.</i> , Persönliche Mitteilung.  | 120               |
| 31. <i>Bosse, O. A.</i> , Fortschritt d. Ther. 9: 540, 1936.   | 111               |
| 32. <i>Bradbury, F. R.</i> , und <i>Jordan, D. O.</i> , Biochem. J., 36: 287, 1942.  | 62                |
| 33. <i>Branham, S. F.</i> , und <i>Rosenthal, S. M.</i> , Pub. Health. Rep., 52: 685, 1937.  | 14                |
| 34. <i>Bratton, A. C.</i> , <i>White, H. J.</i> , und <i>Marshall, E. K.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42: 847, 1939.                            | 52, 69, 70        |
| 35. <i>Britton, C. J. C.</i> , Brit. J. Exp. Path., 19: 140, 1938.   | 50, 54            |
| 36. <i>Broh-Kahn, R. H.</i> , J. Bact., 39: 26, 1940.  | 53, 70            |
| 37. <i>Browning, C. H.</i> , und <i>Gulbransen, R.</i> , J. Path. Bact., 25: 395, 1922.  | 71                |

38. *Burton, H., McLeod, J. W., McLeod, T. S., und Mayr—Hartling, A.*, Brit. J. Exp. Path., 21: 288, 1940. . . . . 50, 52, 54, 69, 70
39. *Buttle, G. A. H.*, Proc. Roy. Soc. Med., 31: 154, 1938. . . . . 15
40. —, *Dewing, T., Foster, G. E., Gray, W. H., Smith, S., und Stephenson, D.*, Biochem. J., 32: 1101, 1938. . . . . 41, 113, 155
41. —, *Gray, W. H., und Stephenson, D.*, Lancet, 1936 I, 1286. . . . . 11, 35, 94, 115
42. —, *Parish, H. J., McLeod, M., und Stephenson, D.*, Lancet, 1937 I, 681. . . . . 49
43. —, *Stephenson, D.*, IIIrd Int. Cong. Microbiol. 1939, Rep. Proc., p. 583. . . . . 42
44. —, —, *Smith, S., Dewing, T., und Foster, G. E.*, Lancet, 1937 I, 1331. . . . . 41, 115
45. *Bürgers*, Deutsche med. Wschr., 1937, 672. . . . . 49
46. —, Zbl. f. Bakt. Orig. I., 144: 223, 1939. . . . . 50
47. *Campanini*, Policlinico, 11: 272, 1896. . . . . 124
48. *Carpenter, C. M.*, IIIrd Int. Cong. Microbiol. 1939, Rep. Proc., p. 595. . . . . 112
49. —, *Barbour, G. M.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41: 354, 1939. . . . . 112
50. —, *Hawley, P. L., und Barbour, G. M.*, Science, 88: 530, 1938. . . . . 112
51. —, —, —, J. Bact., 36, 28, 1938. . . . . 112
52. *Cavalli, L., und Magni, G.*, Zbl. f. Bakt. Orig. I., 150: 25, 1943. . . . . 40
53. *Chandler, C. A., und Janeway, C. A.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 40, 179, 1939. . . . . 52, 54, 63, 111
54. *Chattaway, F. W., Happold, F. C., Lythgoe, B., Sandford, M., und Todd, A. R.*, Biochem. J., 36: Proc. VI, 1942; cit. *Auhagen*<sup>5</sup>. . . . . 81
55. *Christian*, Hyg. Rundschau, 18: 1321, 1908; ref. Chem. Zbl., 1909 I, 101. . . . . 124
56. *Cokkinis, A.*, Brit. Med. J., 1938 I, 1151. . . . . 54
57. *Colebrook, L., Buttle, G. A. H., und O'Meara, R. A. L.*, Lancet, 1936 II, 1323. . . . . 11, 49, 51, 53, 54
58. —, *Kenny, M.*, Lancet, 1936 I, 1279. . . . . 10, 11, 20, 53, 63
59. —, *Maxted, W. R., Morley, C. W., Elliot, S. D., und Mortell, M.*, Lancet, 1942 I, 30. . . . . 118
60. *Cooper, F. B., Gross, P., und Lewis, M.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 40: 37, 1939. . . . . 35
61. —, —, —, Ibid., 47: 58, 1941. . . . . 42
62. —, —, —, Ibid., 47: 421, 1941. . . . . 115
63. —, —, *Mellon, R. R.*, Ibid., 36: 678, 1937. . . . . 35
64. *Cotler, H. Y., Kirchner, M. T., und Romano, M.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 46: 241, 1941. . . . . 118
65. *Crossley, M. L., Northey, E. H., und Hulquist, M. E.*, J. Amer. chem. Soc., 60: 2217, 1938. . . . . 94, 115
66. *Cruickshank, J. C.*, Lancet, 1939 II, 681. . . . . 117
67. *Curnen, E. C., und MacLeod, C. M.*, J. Exp. Med., 75: 77, 1942; ref. Chem. Zbl., 1943 II, 246. . . . . 112
68. *Davis, B. D.*, Science, 95: 78, 1942. . . . . 54, 105
69. —, *Wood, W. B.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 51, 283, 1942; cit. *Klotz*<sup>18a</sup>. . . . . 105
70. *Dellennay, J.*, Pharmace, 25: 254; 545; 26: 177, 1936. . . . . 124
71. *Diczfalusy, E.*, persönliche Mitteilung. . . . . 25
72. —, *Eödlös, Z.*, Magy. Orv. Arch., 44: 341, 1943. . . . . 29, 96

|   | Zitiert auf Seite        |
|---|--------------------------|
| 73. —, <i>Sonkoly, K.</i> , persönliche Mitteilung. . . . .   | 46                       |
| 74. <i>Domagk, G.</i> , Deutsche med. Wschr., 1935, 250. . . . .  | 9, 110                   |
| 75. —, <i>Kli. Wschr.</i> , 1936, 1585. . . . .   | 53, 110                  |
| 76. —, <i>Zeitschr. f. klin. Med.</i> , 132: 775, 1937. . . . .   | 50, 107, 110             |
| 77. —, <i>Kli. Wschr.</i> , 1937, 775. . . . .  | 110                      |
| 78. —, <i>Der Chirurg</i> , 1941, 433. . . . .  | 115                      |
| 79. —, <i>Arch. f. Derm. und Syph.</i> , 184: 330, 1943. . . . .  | 119                      |
| 80. —, <i>Hegler, C.</i> , Chemotherapie bakterieller Infektionen, 1942, Leipzig. . . . .                                 | 18, 25, 53, 83, 97, 109  |
| 81. <i>Dorfman, A., Berkman, S., und Koser, A. S.</i> , J. biol. Chem., 144: 393, 1942. . . . .                           | 149                      |
| 82. <i>Druery, J., und Oesterheld, G.</i> , Helv. Chem. Acta, 25: 753, 1942. . . . .                                      | 46                       |
| 83. <i>van Dyke, H. B., Greep, R. O., Rake, G., und McKee, C. M.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42: 410, 1939. . . . . | 23, 25, 26               |
| 84. <i>Eisenberg, P.</i> , Zbl. f. Bakt. Orig. I., 82: 69, 1919. . . . .  | 124                      |
| 85. <i>Eisterst, B.</i> , Tautomerie und Mesomerie, Stuttgart 1938. . . . .   | 103                      |
| 86. <i>Ekstrand, T.</i> , Svensk kemisk tidskrift, 54: 257, 1942. . . . .   | 101                      |
| 87. <i>Ellinger, A., Heffter, A.</i> , Handb. der exp. Pharmakologie, Bd. I., 1923, Berlin. . . . .                       | 124                      |
| 88. <i>Erlenmeyer, H., Bloch, H., und Kieter, H.</i> , Helv. Chem. Acta, 25: 1066, 1942. . . . .                          | 147                      |
| 89. —, <i>Würgler, W.</i> , Ibid., 25: 249, 1942. . . . .   | 147                      |
| 90. <i>Euler, v. H., und Ahlström, L.</i> , Arkiv för. Kemi, Min. och. Geol., 16: No. 16, 1943. . . . .                   | 145                      |
| 91. —, —, <i>Zeitschr. f. phys. Chem.</i> , 279: 175, 1943. . . . .   | 145                      |
| 92. <i>Feinstone, W. H., Bliss, E. A., Ott, E., und Long, P. H.</i> , Bull. Hopkins Hosp. 62: 565, 1938. . . . .          | 11                       |
| 93. <i>Fenyvessy, B., Kolozsi, V., und Takátsy, G.</i> , Magy. Orv. Arch., 44: 93, 1943. . . . .                          | 20                       |
| 94. <i>Füldes, P.</i> , Brit. J. Exp. Path., 19: 17, 1938. . . . .  | 91, 92                   |
| 95. —, Ibid., 21: 74, 1940. . . . .   | 106                      |
| 96. —, <i>Lancet</i> , 1940 I, 955. . . . .   | 80                       |
| 97. <i>Finklestein, R., und Birkeland, J.</i> , Science, 87: 441, 1938. . . . .   | 111                      |
| 98. <i>Finklestone—Sayliss, H., Paine, G., und Patrick, L. B.</i> , Lancet, 1937 II, 792. . . . .                         | 49, 51, 53, 111          |
| 99. <i>Fischer, A.</i> , Arch. int. Pharmac. et de Ther., 56: 131, 1937. . . . .  | 50                       |
| 100. —, Schweiz. med. Wschr., 1940, 666. . . . .  | 115                      |
| 101. <i>Fleming, A.</i> , Lancet, 1938 II, 564. . . . .   | 53, 63                   |
| 102. —, J. Path. Bact., 50, 69, 1940. . . . .   | 51, 54                   |
| 103. <i>Flosdorf, E. W., und Mudd, S.</i> , J. Immun., 34: 469, 1938. . . . .   | 19                       |
| 104. <i>Fourneau, J., Trefouel, J., Mme. F., und Bovet, D.</i> , Compt. rend. Soc. de biol., 122: 258, 1936. . . . .      | 94                       |
| 105. —, —, —, —, —, Ibid., 122: 652, 1936. . . . .  | 94                       |
| 106. —, —, —, —, —, Bull. Acad. de Med., 118: 210, 1937. . . . .  | 41                       |
| 107. —, —, —, —, —, Ccmpt. rend. Acad. de sc., 204: 1763, 1937. . . . .   | 41, 114                  |
| 108. <i>Fox, C. L.</i> , Illrd Int. Cong. Microbiol., 1939, Rep. Proc., p. 591. . . . .                                   | 68                       |
| 109. —, Science, 91: 477, 1940. . . . .   | 68                       |
| 110. <i>Francis, A. E.</i> , Lancet, 1942 I, 408. . . . .   | 118                      |
| 111. <i>Frei, W.</i> , Schweiz. med. Wschr., 1942, II, 763. . . . .   | 64                       |
| 112. <i>Frisk, R.</i> , Acta Med. Scand., 110: Heft IV—V, 1942. . . . .   | 53, 100, 114             |
| 113. —, Sulfanilamide derivatives, 1943, Stockholm. . . . .   | 42, 43, 52, 98, 100, 116 |
| 114. <i>Fromm, E., und Wittmann, J.</i> , Ber. chem. Ges., 41: 2264, 1908. . . . .  | 41                       |
| 115. <i>Fuller, A. T.</i> , Lancet, 1937 I, 194. . . . .  | 10                       |
| 116. <i>Fuller, A. T.</i> , Illrd. Int. Cong. Microbiol., 1939, Rep. Proc. p. 603. . . . .                                | 69                       |

117. —, *Colerbrook, L.*, Hlrd. Int. Cong. Microbiol., 1939, Rep. Proc., p. 582. . . . . 72
118. —, —, *Maxted, W. R.*, J. Path. Bact., 51: 105, 1940. . . . . 51, 107
119. *Garrod, L. P.*, J. inf. Dis., 57: 247, 1939. . . . . 50
120. *Garoffeau, M.*, und *Joan, E.*, Compt. rend. Soc. de biol., 104: 513, 1930. . . . . 124
121. *Gatenberg, R.*, Deutsche med. Wschr., 1935, 284. . . . . 94
122. *Gay, F. G.*, und *Clark, A. R.*, J. Exp. Med., 66: 535, 1937. . . . . 49, 63, 108, 110
123. *Gärtner, K.*, Zbl. f. Bakt. Orig. I., 150: 97, 1943. . . . . 62, 63
124. *Gelmo, P.*, J. pakt. Chem., 77: 369, 1908. . . . . 10
125. *Goissedet, P.*, *Despois, R.*, *Galliot, T.*, und *Mayer, R.*, Compt. rend. Soc. de biol., 121: 1082, 1936. . . . . 10
126. *Gray, W. H.*, *Buttle, G. A. H.*, und *Stephenson, D.*, Biochem. J., 31: 724, 1937. . . . . 10
127. *Green, H. N.*, Brit. J. Exp. Path., 21: 38, 1940. . . . . 51, 52, 72, 75
128. —, *Bielschowsky, F.*, Ibid., 23: 1, 1942. . . . . 79, 121
129. —, —, Ibid., 23: 13, 1942. . . . . 71
130. *Gross, B.*, und *Cooper, F. B.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 36: 533, 1937. . . . . 18
131. —, —, Ibid., 36: 774, 1937. . . . . 18
132. —, —, *Lewis, M.*, Ibid., 42: 421, 1939. . . . . 27
133. —, —, —, J. inf. Dis., 65: 97, 1939. . . . . 112
134. —, —, *Peebles, M. L.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 36: 311, 1937. . . . . 111
135. *Gruhzit, O. M.*, Arch. Path., 29: 732, 1940. . . . . 83
136. *Grumbach, A.*, Schweiz. Zeitschr. Path. und Bakt. 4: 455, 1941. . . . . 53
137. —, *Hegglin, R.*, Schweiz. med. Wschr., 1942, 1369. . . . . 118
138. *Gunn, F. D.*, und *Nungester, W. J.*, Arch. Path., 21: 813, 1936. . . . . 18
139. *Habs, H.*, und *Bader, R.*, Zeitschr. f. Immun. forschg., 94: 66, 1938. . . . . 18
140. *Harris, J. H.*, und *Kohn, H.*, Science, 92: 11, 1940. . . . . 119
141. —, —, J. Pharm. Exp. Ther., 73: 383, 1941. . . . . 75, 77, 90
142. *Harrow, B.*, *Mazur, A.*, und *Sherwin, C. P.*, J. biol. Chem., 102: 35, 1933. . . . . 109
143. *Hatzfeld, A.*, Inaug. Diss. Würzburg 1908; cit. *Ellinger*<sup>87</sup>. . . . . 124
144. *Helmholz, H. F.*, Proc. Mayo Clin., 12: 244, 1937. . . . . 49, 54
145. *Heide, C.*, und *Jakob, F.*, Zeitschr. f. Unters. Nahrgrs. Genussmittel, 19: 137, 1910. . . . . 124
146. *Heidelberger, M.*, und *Jacobs, W. A.*, J. Amer. chem. Soc., 41: 2143, 1919. . . . . 11
147. *Hilles, C.*, und *Schmidt, L. H.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 40: 73, 1939. . . . . 63
148. *Hirsch, J.*, Compt. rend. ann. Soc. Turque Sc., Phys. et Nat., Fasc. 10: 1942. . . . . 51, 53, 64, 73, 83
149. —, Ibid., 10, 1, Sitzung. am 8. 5. 1942. . . . . 83
150. *Hoare, E. D.*, Lancet, 1938 I, 655. . . . . 49, 51, 53, 54
151. *Hoyt, R. E.*, und *Levine, M.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 40, 465, 1939. . . . . 63
152. *Huntington, R. W.*, Ibid., 38: 328, 1938. . . . . 112
153. *Hückel, W.*, Theor. Grundlagen der organischen Chemie, III Aufl., 1940, Bd. I und II, Leipzig. . . . . 103
154. *Illényi, A.*, Biochem. Zeitschr., 311: 19, 1942. . . . . 65
155. *Isbell, H.*, J. biol. Chem., 144: 567, 1942. . . . . 81
156. *Ivánovics, G.*, Zeitschr. f. Immun. forschg., 96: 252, 1939. . . . . 117
157. —, J. Path. Bact., 51: 91, 1940. . . . . 27, 36, 39

|   | Zitiert auf Seite                       |
|---|---|
| 158. — , Praxis, 29, Nr. 33, 1940. . . . .  | 16, 29, 54, 108                         |
| 159. — , Zeitschr. f. Immun. forschg., 101, 58, 1941. . . . .   | 53, 56, 73, 74, 75, 97, 100, 118, 121   |
| 160. — , Ibid., 102: 238., 1942. . . . .  | 73, 74, 75, 83, 84, 125.                |
| 161. — , Naturwissenschaft., 1942, 104. . . . .   | 125                                     |
| 162. — , Kli. Wschr., 1942, 343. . . . .  | 125                                     |
| 163. — , Zeitschr. f. phys. Chem., 276: 33, 1942. . . . .   | 125                                     |
| 164. — , Schweiz. Zeitschr. Path. Bakt., 6: 298, 1943. . . . .  | 52, 56, 118                             |
| 165. — , Zeitschr. f. Immun. forschg., 103: 469, 1943. . . . .  | 53, 56, 74, 81, 84, 95, 96, 97, 98, 100 |
| 166. — , Orvostudományi Közlemények, 1943, Nr. 3. . . . .   | 53, 87                                  |
| 167. — , nicht publizierte Versuche. . . . .  | 75, 83, 95, 97, 115, 118                |
| 168. — , <i>Diczfalussy, E.</i> , nicht publizierte Versuche. . . . .   | 43, 96                                  |
| 169. — , <i>Eötlös, Z.</i> , Zbl. Bakt. Orig. I., 150: 385, 1943. . . . .   | 59                                      |
| 170. — , — , nicht publizierte Versuche. . . . .  | 140                                     |
| 171. — , <i>Sonkoly, K.</i> , nicht publizierte Versuche. . . . .   | 128                                     |
| 172. — , <i>Gieszer, G. N., Eötlös, Z.</i> , und <i>Diczfalussy, E.</i> , Kli. Wschr., 1942, 1096. . . . .                                | 18                                      |
| 173. <i>James, G. V.</i> , und <i>Fuller, A. T.</i> , Biochem. J., 34: 648, 1940. . . . .   | 95                                      |
| 174. <i>Jancsó, v. N.</i> , und <i>Jancsó, v. H.</i> , Zeitschr. f. Immun. forschg., 88: 275, 1936. . . . .                               | 71                                      |
| 175. — , — , II. Int. Cong. Microbiol., 1936, Rep. Proc., p. 291. . . . .   | 71                                      |
| 176. <i>Jensen, K. A.</i> , und <i>Fridieger, A.</i> , Dansk Tidsskrift Farmaci, 16: 280, 1942; ref. Chem. Zbl., 1943 I, 474. . . . .     | 101                                     |
| 177. — , <i>Schmith, K.</i> , Kemisk Maanedssblad, 1942, Nr. 5, 73. . . . .   | 101                                     |
| 178. — , — , Zeitschr. f. Immun. forschg., 102, 261, 1942. . . . .  | 73, 85, 95, 97, 98, 100, 101, 114       |
| 179. — , — , <i>Brandt, P.</i> , Kli. Wschr., 1942, 1042. . . . .   | 97                                      |
| 180. <i>Johnson, F. H.</i> , Science, 95: 509, 1942; ref. Chem. Zbl., 1943 I, 1491. . . . .   | 75                                      |
| 181. <i>Kapp, E. M.</i> , und <i>Coburn, A. F.</i> , Brit. J. Exp. Path., 17: 255, 1936. . . . .  | 144                                     |
| 182. <i>Kaufmann, F.</i> , und <i>Schmith, K.</i> , Acta path., 20: 1, 1942. . . . .  | 14                                      |
| 183. <i>Keilin, D.</i> , und <i>Hartree, G. F.</i> , Nature, 134: 933, 1934. . . . .  | 69                                      |
| 184. <i>Keltch, A. K., Baker, L. A., Krahl, M. E.</i> , und <i>Clowers, G. H. A.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47: 533, 1941. . . . . | 73                                      |
| 185. <i>Kimmig, J.</i> , Kli. Wschr., 1941, 233. . . . .  | 73                                      |
| 186. — , Ibid., 1943, 31. . . . .   | 54, 73, 109, 118, 119                   |
| 187. — , <i>Weselman, H.</i> , Arch. f. Derm. und Syph., 182: 436, 1941. . . . .  | 54, 105                                 |
| 188. <i>Kiss, v. A.</i> , und <i>Gerendás, M.</i> , Acta Chem., Miner., Phys. Univ. Szeged, 4: 272, 1936; 5: 153, 1937. . . . .           | 102                                     |
| 189. <i>Kiss, v. A.</i> , und <i>Ivánovics, G.</i> , nicht publizierte Versuche . . . . .   | 101                                     |
| 190. <i>Klarer, J.</i> , Kli. Wschr., 1941, 1251. . . . .   | 97                                      |
| 191. <i>Klee, Ph.</i> , und <i>Römer, H.</i> , Deutsche med. Wschr., 1935, 255. . . . .   | 9                                       |
| 192. <i>Klein, J. R.</i> , und <i>Kamin, H.</i> , J. biol. Chem., 138: 507, 1941. . . . .   | 145                                     |
| 193. <i>Klinefelter, H. F.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 46: 591, 1941. . . . .   | 42                                      |
| 194. <i>Klotz, J. M.</i> , Science, 98: 60, 1943. . . . .   | 105                                     |
| 195. <i>Knight, B. C. J. G.</i> , Biochem. J., 31: 731, 1937. . . . .   | 56                                      |
| 196. <i>Kohl, M. F. F.</i> , und <i>Flynn, L. M.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 44: 455, 1940. . . . .                                 | 95                                      |

|   | Zitiert auf Seite                      |
|---|--|
| 197. Kohn, H. J., und Harris, J. S., J. Pharm. Exp. Ther., 73: 343, 1941.   | 64, 65, 66,<br>120                     |
| 198. Kolbe, H., J. f. prakt. Chem., 11: 9, 1875.  | 124                                    |
| 199. Kolbe und Lautemann, Liebigs Ann., 115: 157, 178, 1860.  | 124                                    |
| 200. Kuhn, R., Die Chemie, 55: 1, 1942.   | 85, 147                                |
| 201. —, Schwarz, K., Ber. chem. Ges., 74: 121, 1942.  | 80                                     |
| 202. —, Wieland, Th., Ber. chem. Ges., 75: 121, 1942.   | 138, 142                               |
| 203. —, —, Möller, E. F., Ber. chem. Ges., 74: 1605, 1941.  | 148                                    |
| 204. —, Birkhofer, L., und Möller, E. F., Ber. chem. Ges., 76: 900, 1943.   | 135                                    |
| 205. —, Möller, E. F., und Wendt, G., Ber. chem. Ges., 76: 405, 1943.   | 83                                     |
| 206. —, Weygand, F., und Möller, E. F., Ber. chem. Ges., 76: 1044, 1943.  | 149                                    |
| 207. —, Möller, E. F., Wendt, G., und Beinert, H., Ber. chem. 75: 711, 1942.  | 74, 75, 83,<br>85, 87                  |
| 208. Kumler, W. D., und Halverstadt, I. F., J. Amer. chem. Soc., 63: 2182, 1941, ref. Chem. Zbl., 1942 I, 474.                              | 101                                    |
| 209. Lajos, A., Biochem. Zeitschr., 311: 92, 1942.  | 64, 69                                 |
| 210. Lampen, J. O., Underkofler, L., und Peterson, N. H., J. biol. Chem., 146: 277, 1942.   | 81                                     |
| 211. Landy, M., und Dickens, D. M., J. biol. Chem., 146: 109, 1942.   | 81, 82                                 |
| 212. —, Wyeno, J., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 46: 59, 1941.  | 54, 63, 73,<br>74, 75, 85              |
| 213. Läger, P., und Martin, H., Schweiz. med. Wschr., 1943, 399.  | 99                                     |
| 214. Levaditi, C., Compt. rend. Soc. de biol., 135: 1109, 1941.   | 73                                     |
| 215. —, Vaisman, A., Press Med., 43, 1097, 1935.  | 17                                     |
| 216. —, —, Compt. rend. Soc. de biol., 119: 946, 1935.  | 17, 63, 108                            |
| 217. —, —, Ibid., 120: 1072, 1935.  | 112                                    |
| 218. —, —, Compt. rend. Acad. de sc., 200: 1694, 1935.  | 110                                    |
| 219. —, Girard, A., und Vaisman, A., Compt. rend. Soc. de biol., 127: 19, 1938.   | 97                                     |
| 220. Libby, R. L., J. Bact., 40: 733, 1940.   | 66                                     |
| 221. Lipmann, F., J. biol. Chem., 139: 977, 1940.   | 81                                     |
| 222. Litchfield, J. T., White, H. J., und Marshall, E. K., J. Pharm. Exp. Ther., 67: 437, 1939.   | 28, 41, 42                             |
| 223. —, —, Ibid., 69: 166, 1940.  | 43, 114                                |
| 224. Locke, A., und Mellon, R. R., Science, 90: 231, 1939.  | 68                                     |
| 225. —, Main, E. R., und Mellon, R. R., Ibid., 88: 620, 1938.   | 68                                     |
| 226. —, —, —, J. Immun., 36: 183, 1939.   | 68                                     |
| 227. Lockwood, J. S., J. Immun., 35: 155, 1938.   | 51, 52, 63,<br>71, 120                 |
| 228. —, Lynch, J., J. Amer. Med. Ass., 114: 935, 1940.  | 51, 71                                 |
| 229. —, Robinson, H. J., J. Pharm. Exp. Ther., 68: 201, 1940.   | 40, 95                                 |
| 230. Loewenthal, H., Lancet, 1937 I, 147.   | 12, 17                                 |
| 331. Long, P. H., und Bliss, E. A., The Clinical and Experimental Use of Sulfanilamide, Sulfapyridine and Allied Compounds, New-York, 1939. | 20, 51                                 |
| 232. —, —, J. Amer. Med. Ass., 108, 32, 1937.   | 10, 20, 28,<br>49, 51, 52,<br>107, 110 |
| 233. —, Feinstone, W. H., Proc. Soc. Exp. Biol. Méd., 39: 486, 1938.  | 25                                     |
| 234. —, —, Bliss, E. A., cit. Schmith <sup>228</sup> .  | 63                                     |
| 235. —, Bliss, E. A., und Feinstone, W. H., Penn. Med. J., 67: 79; cit. Raiziss et al <sup>304</sup> .                                      | 36                                     |
| 236. Loomis, T. A., Hubbard, R. S., und Neter, E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47: 395, 1941.   | 79                                     |
| 237. Lowell, F. C., Strauss, E., und Finland, M., Ann. intern. Med., (Boston), 14: 1001, 1940.  | 118, 119                               |
| 238. Löhe, H., und Brett, R., Dermat. Wschr., 1942, 981.  | 109                                    |

|   | Zitiert auf Seite                    |
|---|--------------------------------------|
| 239. <i>McCarty, M.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 46: 133, 1941. . . . .  | 108                                  |
| 240. <i>McIlwain, H.</i> , Brit. J. Exp. Path., 21: 136, 1940. . . . .  | 147                                  |
| 241. —, <i>Ibid.</i> , 23: 95, 1942. . . . .  | 149                                  |
| 242. —, <i>Ibid.</i> , 23: 265, 1942. . . . .   | 109                                  |
| 243. —, <i>Science</i> , 95: 509, 1942; ref. Chem. Zbl., 1943 I, 1491. . . . .  | 75                                   |
| 244. —, <i>Biochem. J.</i> , 36: 417, 1942; ref. Chem. Zbl., 1943 II, 41. . . . .   | 149                                  |
| 245. —, <i>Lancet</i> , 1942 I, 412. . . . .  | 147                                  |
| 246. <i>MacIntosh, J.</i> , und <i>Whitby, L. E. H.</i> , <i>Lancet</i> , 1939 I, 431. . . . .  | 51, 52, 53,<br>63, 72, 107,<br>111   |
| 247. <i>McKee, C. M.</i> , <i>Rake, G.</i> , <i>Greep, R. O.</i> , und <i>van Dyke, H. B.</i> ,<br>Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42: 417, 1939. . . . .                               | 34, 41, 42                           |
| 248. <i>McKinney, R. A.</i> , und <i>Mellon, R. R.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,<br>37: 333, 1937. . . . .  | 110                                  |
| 249. <i>MacLean, I. H.</i> , und <i>Rogers, K. A.</i> , und <i>Fleming, A.</i> , <i>Lancet</i> ,<br>1939 I, 562. . . . .  | 14, 118                              |
| 250. <i>MacLeod, C. M.</i> , J. Amer. Med. Ass., 113: 1405, 1939. . . . .   | 14, 15                               |
| 251. —, J. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41: 215, 1939. . . . .   | 64                                   |
| 252. —, J. Exp. Med., 72: 217, 1940. . . . .  | 51, 53, 73,<br>76, 109, 120,<br>122. |
| 253. —, <i>Daddi, G.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41: 69, 1939. . . . .  | 119                                  |
| 254. <i>Madison, R. R.</i> , und <i>Snow, J. F.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol.<br>Med., 36: 592, 1937. . . . .   | 112                                  |
| 255. <i>Main, E. R.</i> , und <i>Shinn, L. E.</i> , J. biol. Chem., 128: 417, 1939. . . . .   | 68                                   |
| 256. —, —, <i>Mellon, R. R.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39:<br>272, 1938. . . . .   | 68                                   |
| 257. —, —, —, <i>Ibid.</i> , 42: 115, 1939. . . . .   | 68                                   |
| 258. —, —, —, <i>Ibid.</i> , 43: 593, 1940. . . . .   | 68                                   |
| 259. <i>Marshall, E. K.</i> , <i>Bratton, A. C.</i> , und <i>Litchfield, J. F.</i> , <i>Science</i> ,<br>88: 597, 1938. . . . .   | 24                                   |
| 260. —, —, <i>White, H. J.</i> , und <i>Litchfield, J. F.</i> , Bull. Hopkins<br>Hosp., 67: 163, 1940. . . . .  | 23, 25                               |
| 261. —, <i>Cutting</i> ; cit. <i>Litchfield et al.</i> <sup>222</sup> . . . . .   | 25, 41, 43,<br>115                   |
| 262. —, <i>Litchfield, J. F.</i> , <i>White, H. J.</i> , J. Pharm. Exp. Ther.,<br>69: 89, 1940. . . . .   | 41, 42, 43,<br>114, 115              |
| 263. <i>Martin, G. J.</i> , und <i>Fischer, C. V.</i> , J. biol. Chem. 144: 289, 1942. . . . .  | 108, 109, 117                        |
| 264. —, <i>Wisansky, W. A.</i> , und <i>Ansbacher, S.</i> , Proc. Soc. Exp.<br>Biol. Med., 47: 26, 1941. . . . .  | 81                                   |
| 265. <i>Matti, J.</i> , <i>Nitti, F.</i> , <i>Morel, M.</i> und <i>Lwoff, A.</i> , Ann. Inst. Pas-<br>teur, 67: 240, 1941; cit. <i>Möller und Birkofer</i> <sup>280</sup> . . . . . | 147                                  |
| 266. <i>May, H. B.</i> , und <i>Buck, S. C.</i> , <i>Lancet</i> , 1939 II, 685. . . . .   | 117                                  |
| 267. <i>Mayer, R. L.</i> , Biol. méd., (Supplement), 27: 45, 47, 1937. . . . .  | 24                                   |
| 268. —, Bull. Acad. Méd., Paris, 117: 727, 1937. . . . .  | 67, 69                               |
| 269. —, <i>Oechslein, C.</i> , Compt. rend Soc. de biol. 130: 211, 1939. . . . .  | 83, 116                              |
| 270. <i>Mellon, R. R.</i> , und <i>Bambas, L. C.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med.,<br>36: 682, 1937. . . . .  | 63                                   |
| 271. —, <i>Gross, P.</i> , und <i>Cooper, F. B.</i> , J. Amer. Med. Ass.,<br>108: 1858, 1937. . . . .   | 110                                  |
| 272. —, —, —, Sulfanilamide Therapy of Bacterial Infections,<br>Baltimore, 1938. . . . .  | 18, 111                              |
| 273. —, <i>McKinney, R. A.</i> , Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 42: 677, 1939. . . . .   | 63                                   |
| 274. —, <i>Shinn, L. E.</i> , <i>Ibid.</i> , 37: 331, 1937. . . . .   | 52                                   |
| 275. <i>Mietzsch, F.</i> und <i>Klarer, J.</i> , D. R. P., 607537, 1935. . . . .  | 9                                    |
| 276. <i>Müller, J. K.</i> , J. Bact., 37: 228, 1939. . . . .  | 14                                   |
| 277. —, <i>Ibid.</i> , 42: 133, 1941. . . . .   | 73                                   |
| 278. <i>Müller, E.</i> , <i>Rock, H. J.</i> , und <i>Moore, M. L.</i> , J. Amer. chem. Soc.,<br>61: 1198, 1939. . . . .   | 95, 118                              |
| 279. <i>Moore, F. J.</i> , <i>Thomas, R. E.</i> , und <i>Hoyt, A.</i> , J. Amer. Med. Ass.,<br>117: 437, 1941; cit. <i>Grumbach und Hegglin</i> <sup>137</sup> . . . . .            | 118                                  |
| 280. <i>Möller, E. F.</i> und <i>Birkofer, L.</i> , Ber. chem. Ges., 75: 1118, 1942. . . . .  | 147                                  |

281. — , Schwarz, K., Ber. chem. Ges., 74: 1612, 1942. . . . . 53, 56, 73, 80, 85, 97, 148
282. Muir, R. D., Shamler, V. J. und Jones, L. R., Proc. Soc-Exp. Biol. Med., 47: 77, 1941. . . . . 53
283. Neter, E., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41: 62, 1939. . . . . 112
284. Neufeld, F., und Baer, F., Zeitschr. f. Hyg., 123: 119, 1942. . . . . 111
285. Nitti, F., und Bovet, D., Compt. rend. Soc. de biol., 119: 1277, 1935. . . . . 20
286. — , — , Compt. rend. Acad. sc., 202: 1221, 1936. . . . . 17
287. — , — , Depierre, E., Compt. rend. soc. de biol., 124: 15, 1937. . . . . 49, 51, 94
288. — , — , Hamon, V., Ibid., 128: 26, 1938. . . . . 97
289. — , Tabon, J., Ann. Inst. Pasteur, 68, 360, 1942. . . . . 53, 79
290. Northey, E. H., Chem. Reviews, 27: 85, 1940. . . . . 93, 100
291. Nungester, W. J., und Jourdanais, L. F., J. Bact., 29: 34, 1933. . . . . 18
292. O'Meara, R. A. Q., und Macsween, J., J. Path. Bact., 43: 373, 1936. . . . . 21
293. Ordal, Z. J., und Halvorson, H. O., J. Bact., 40: 148, 1940. . . . . 64
294. Osgood, E. E., und Browlee, I. E., J. Amer. Med. Ass., 110: 394, 1938 . . . . . 111, 112
295. — , Powell, H. M., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39: 37, 1938. . . . . 112
296. Pearl, R., Introduction to Medical Biometry and Statistics, 1930. . . . . 30
297. Pelczar, M. J., und Porter, J. R., J. biol. Chem., 193: 110, 1941. . . . . 133, 138
298. Prigge, R., Kli. Wschr., 1941, 633. . . . . 33
299. Proom, H., Lancet, 1937 I, 16. . . . . 17
300. Pulver, R., und Martin, H., Arch. f. exp. Path. und Pharm. 201, 491, 1943. . . . . 98, 99
301. — , Suter, R., Schweiz. med. Wschr., 1943, 403. . . . . 99
302. Quick, A. J., J. biol. Chem., 96: 83, 1932. . . . . 109
303. Raiziss, G. W., Severac, M., Moetsch, J. C., und Clement, L. W., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39: 339, 1938. . . . . 41, 63
304. — , — , — , — , Ibid., 42: 12, 1939. . . . . 28
305. — , — , — , — , Ibid., 46: 361, 1941. . . . . 28
306. Rammelkamp, Ch. H., und Juvell, M. L., Ibid., 45: 168, 1940. . . . . 53, 54
307. — , Keefers, C. S., Ibid., 43: 664, 1940. . . . . 53
308. Régnier, J., David, R., und Kaplan, A., Compt. rend. Acad. de sc., 194: 323, 1932.. . . . 63
309. Reichel, H.; Kolle, Kraus, Uhlenhuth: Handb. d. Path. Miro-roorg., III. Auf. Bd. III. 835. . . . . 125
310. Reid, R. D., Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 41: 437, 1939. . . . . 63, 107, 110
311. Rose, H. M., und Fox, C. L., Science, 95: 412, 1942. . . . . 51, 52, 67, 87
312. Rosenthal, S. M., Publ. Health Rep., 52: 48, 1937. . . . . 20, 35
313. — , Ibid., 52: 192, 1937. . . . . 50, 54
314. — , Bauer, H., Ibid., 52: 622, 1937. . . . . 23, 24, 52
315. — , — , Ibid., 54: 1880, 1939. . . . . 68, 70
316. — , — , Elvolve, E., Ibid., 54: 1317, 1939. . . . . 115, 117
317. Ross, R. W., Lancet, 1939 I, 1205. . . . . 119
318. Rubbo, S. D., und Gillispiet, J. M., Nature, 146: 838, 1940. . . . . 80
319. — , — , Lancet, 1942 I, 36. . . . . 53, 74, 80, 81, 86
320. Sahyun, M., Beard, P., Schultz, E. W., Snow, J., und Gross, E., J. inf. Dis., 56: 28, 1936. . . . . 57, 76, 131



321. *Scanga, F.*, Rc. Inst. San. publ., 4: 381, 1941; ref. Ber. Ges. Phys., 128: 549, 1942. . . . . 63
322. *Schlenk, O.*, Pharmaz. Ind., 8: 217, 1941. . . . . 124
323. *Schmidt, L. H.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 37: 205, 1937. . . . . 41
324. —, *Hilles, C.*, Ibid., 40: 611, 1939. . . . . 27, 28, 39
325. —, —, Ibid., 41: 111, 1939. . . . . 15
326. —, —, Ibid., 43: 288, 1940. . . . . 118
327. —, *Sesler, C.*, und *Dettwiler, H. A.*, J. Pharm. Exp. Ther., 74: 175, 1942; ref. Chem. Zbl., 1943 I, 1905. . . . . 119
328. *Schmith, K.*, Experimental studies on the sulfapyridine on pneumococci and gonococci, Kjobenhavn, 1941. . . . . 14, 15, 22, 25, 39, 51, 52, 54, 63, 91, 106, 118
329. *Schneierson, S. S.*, J. inf. Dis., 65: 97, 1939. . . . . 112
330. *Schöring, K.*, Zeitschr. f. ges. exp. Med., 111: 585, 1942. . . . . 64
331. *Schreus, H. Th.*, Deutsche med. Wschr., 1935, 235. . . . . 9
332. —, Kli. Wschr., 1942, 671. . . . . 97
333. — und Mitarbeitern, Kli. Wschr., 1941, 504, 529, 705, 1233; 1942, 14. . . . . 18
334. *Scudi, J. V.*, und *Graessle, O.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 46: 364, 1941. . . . . 25
335. *Seaston, C. V.*, J. Immun., 33: 403, 1937. . . . . 18, 20, 41
336. *Selbie, F. R.*, Brit. J. Exp. Path., 21: 74, 1940. . . . . 108
337. *Sevag, M. G.*, und *Maiweg, L.*, Biochem. Zeitschr., 288: 41, 1936. . . . . 69
338. —, *Shelburne, M.*, und *Ibsen, Y.*, J. biol. Chem., 144: 710, 1942. . . . . 70
339. *Shaffer, P. A.*, IIIrd Int. Cong. Microbiol., 1939, Rep. Proc., p. 592. . . . . 68
340. —, Science, 89: 547, 1939. . . . . 68
341. *Shinn, L. E.*, *Main, E. R.*, und *Mellon, R. R.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 39: 591, 1938. . . . . 68
342. —, —, —, Ibid. 39: 640, 1938. . . . . 68
343. —, —, —, Ibid., 42: 736, 1939. . . . . 68
344. *Snell, E. E.*, J. biol. Chem., 139: 975, 1941. . . . . 149
345. *Spink, W. W.*, und *Jermsta, A.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 47: 395, 1941. . . . . 73
346. *Stamp, T. C.*, Lancet, 1939 II, 10. . . . . 72, 120
347. *Staub, H.*, Schweiz. med. Wschr., 1943, 552. . . . . 147
348. *Stickl, O.*, und *Gärtner, K.*, Deutsche med. Wschr., 1942, 509. . . . . 118
349. *Strauss, E.*, und *Finland, M.*, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 47: 428, 1941. . . . . 51, 54
350. —, *Dingle, J. H.*, und *Finland, M.*, Ibid., 46: 131, 1941. . . . . 73
351. —, *Lowell, F. C.*, und *Finland, M.*, J. clin. Invest., 20: 189, 1941; ref. Ber. ges. Phys., 126: 382, 1941. . . . . 108
352. *Strugger*, Deutsche tierärztl. Wschr., 1942, 121. . . . . 62
353. *Subbarow, J.*, und *Rane, L.*, J. Amer. Chem. Soc., 61: 1616, 1939. . . . . 143
354. *Tabone, J.*, und *Nitti, F.*, Ann. Inst. Pasteur, 68: 416, 1942. . . . . 79
354. —, —, *Mousset, H.*, Ibid., 68: 470, 1942. . . . . 79
356. —, —, *Senecal, M.*, und *Mousset, H.*, Ibid., 69: 253, 303, 1943. . . . . 79
357. *Tatum, E. L.*, und *Beadle, G. W.*, Proc. Nat. Acad. Sc. 28: 234, 1942; cit. *Lampen et al.*<sup>210</sup> . . . . . 81
358. *Telling, M.*, und *Oliver, W. A.*, Lancet, 1938 I, 1931. . . . . 63
359. *Thorpe, W. V.*, *Tecwyn, W.*, und *Shelswell, J.*, Biochem. J., 35: 52, 1941; ref. Ber. ges. Phys., 131: 156, 1943. . . . . 70
360. *Topley, W. W. C.*, und *Wilson, G. S.*, The Principles of Bacteriology and Immunity, Hnd Edition. . . . . 70
361. *Tréfouel, J.*, *Tréfouel, J. Mme.*, *Nitti, F.*, und *Bovet, D.*, Compt. rend. Soc. de biol. 120: 756, 1935. . . . . 9
362. —, —, —, —, Ann. Inst. Pasteur, 58: 30, 1937. . . . . 94, 95, 115
363. *Tunnickliff, R.*, J. inf. Dis., 64: 59, 1939. . . . . 111

|  | Zitiert auf Seite            |
|--|------------------------------|
| 364. <i>Váczy, L., und Kiss, P., persönliche Mitteilung.</i>   | 64                           |
| 365. <i>Vetró, J., Orvostudományi Közlemények, 1941, Nr. 12.</i>   | 54, 118                      |
| 366. <i>Virtanen, A. I., und Laine, T., Biochem. J., 33: 412, 1939.</i>  | 138                          |
| 367. <i>Voegtlin, C., Dyer, H. A., und Leonhard, C. S., Publ. Health Rep., 38: 1882, 1923.</i>                                 | 71                           |
| 368. <i>Vonkennel, J., Deutsche med. Wschr., 1942, Nr. 39—40.</i>  | 25                           |
| 369. —, <i>Kimmig, J., Kli. Wschr., 1941, 3.</i>   | 100                          |
| 370. —, —, <i>Lembke, Deutsche med. Wschr., 1943, 129.</i>   | 62, 91                       |
| 371. <i>Weed, L. A., und Ecker, E. E., J. inf. Dis., 57: 247, 1935.</i>  | 50                           |
| 372. <i>Wehland, C. W., und Pauling, L., J. Amer. chem. Soc., 57: 2086, 1935.</i>  | 104                          |
| 373. <i>Weis, O., und Jones, L. R., J. Bact., 41: 82, 1941.</i>  | 73                           |
| 374. <i>Weid, J. T., und Mitchell, L. C., J. Bact., 38: 335, 1939.</i>   | 51, 52                       |
| 375. <i>West, R., und Coburn, A. F. J. Exp. Med. 72: 91, 1940.</i>   | 75                           |
| 376. <i>Westfal, L., Charles, R. L., und Carpenter, S. M., J. Bact., 39: 47, 1940.</i>   | 119                          |
| 377. <i>Whitby, L. E. A., Lancet, 1937 I, 1517.</i>  | 10, 40, 95, 115              |
| 378. —, <i>Ibid., 1938 I, 1210.</i>  | 15, 27, 33, 35, 41, 101, 115 |
| 379. <i>White, B., The Biology of Pneumococci, New-York, 1938.</i>   | 16                           |
| 380. <i>White H. J., J. Bact., 38: 549, 1939.</i>  | 54                           |
| 381. —, <i>Litchfield, J. T., und Marshall, E. K., Pharm. Exp. Ther., 73: 104, 1941; ref. Erg. ges. Phys., 130: 110, 1942.</i> | 116                          |
| 382. —, <i>Parker, J. M., J. Bact., 36: 481, 1938.</i>   | 52                           |
| 383. <i>Wieland, Th., und Möller, E. F., Zeitschr. phys. Chem., 269: 227; 272: 232, 1942.</i>                                  | 138                          |
| 384. <i>Williams, R. J., und Major, R. T., Science, 91: 246, 1940.</i>   | 138                          |
| 385. <i>Wilson, G. S., J. Bact., 7: 405, 1922.</i>   | 63                           |
| 386. —, <i>J. of Hyg., 25: 150, 1926.</i>  | 63                           |
| 387. <i>Winkler, K. G. Leeuwenhoek 8, 10, 1942; ref. Ber. ges. Phys. 130: 654, 1942.</i>                                       | 64                           |
| 388. —, <i>Julius, H. W., Ibid., 7: 161; 1941; ref. Ber. ges. Phys., 130: 110, 1942.</i>                                       | 70                           |
| 389. —, —, <i>ref. Ber. ges. phys., 132: 397, 1943.</i>  | 51                           |
| 390. <i>Wolff, L. K., und Julius, H. W., Ann. Inst. Pasteur, 62: 616, 1939.</i>  | 54                           |
| 391. <i>Wood, W. B., J. Exp. Med., 75: 369, 1942; ref. Chem. Zbl., 1943 II, 534.</i>   | 53                           |
| 392. —, <i>Austrian, R., Ibid., 75: 383, 1942; ref. Ibid., 1943 II, 535.</i>   | 75                           |
| 393. <i>Woods, D. D., Brit. J. Exp. Path., 21: 74, 1940.</i>   | 72, 73, 74, 85, 90           |
| 394. <i>Woolley, D. W., und Hutchings, B. L., J. Bact., 38: 285, 1939; 39: 287, 1940.</i>                                      | 142                          |
| 395. <i>Wright, A. E., Colebrook, L., und Storer, E. J., Lancet, 1923 I, 365.</i>  | 53                           |
| 396. <i>Wright, H. D., J. Path. Bact., 37: 257, 1943.</i>  | 21                           |